

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-508994

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)10月13日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/29	Z N A		
A 6 1 K 39/36	A B F	9284-4C	
39/395	N	9284-4C	
C 0 7 K 13/00		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平5-502370
 (86)(22)出願日 平成4年(1992)7月10日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)1月10日
 (86)国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 5 6 6 1
 (87)国際公開番号 W O 9 3 / 0 1 2 1 3
 (87)国際公開日 平成5年(1993)1月21日
 (31)優先権主張番号 7 2 9 , 1 3 4
 (32)優先日 1991年7月12日
 (33)優先権主張国 米国 (U S)
 (31)優先権主張番号 7 3 0 , 4 5 2
 (32)優先日 1991年7月15日
 (33)優先権主張国 米国 (U S)

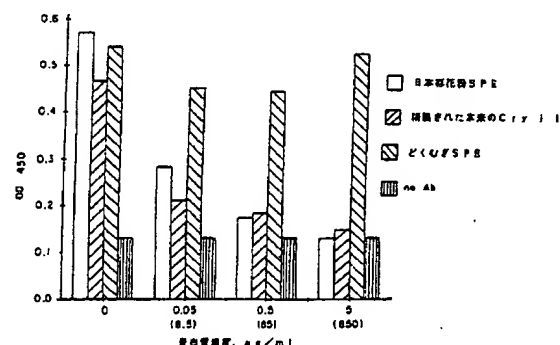
(71)出願人 イミューロジク・ファーマシューチカル・コーポレーション
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02154ウオルサム・リンカーンストリート610
 (72)発明者 グリフィス, アーウィン・ジェイ
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州01864ノースリーディング・サウスウイツクロード13
 (72)発明者 ボロツク, ジョアン
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02174アーリントン・ニューコムストリート51
 (74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 日本杉花粉からのアレレルゲン性蛋白質及びペプチド

(57)【要約】

本発明はクリプトメリア ジャポニカ主要花粉アレレルゲンCry j I及びそのフラグメントをコードする核酸配列を提示する。本発明はCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントをコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製Cry j I及び少なくとも1個のそのフラグメント、ならびに合成的に製造されたCry j Iのフラグメントも提示する。Cry j I及びそのフラグメントは日本杉花粉症の診断、処置及び予防に有用である。



請求の範囲

1. 日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同等物。
2. 該核酸配列が配列番号: 1の塩基66-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求の範囲1に記載の核酸配列。
3. 該核酸配列が配列番号: 1の塩基129-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求の範囲1に記載の核酸配列。
4. 該核酸配列が基本的に配列番号: 1の核酸配列のコード部分の少なくとも1個のフラグメントを含むことを特徴とする、請求の範囲1に記載の核酸配列。
5. 日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同等物を含む発現ベクター。
6. 該核酸配列が配列番号: 1の塩基66-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求の範囲5に記載の発現ベクター。
7. 該核酸配列が配列番号: 1の塩基129-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求の範囲5に記載の発現ベクター。
8. 該核酸配列が基本的に配列番号: 1の核酸配列のコード部分の少なくとも1個のフラグメントを含むことを特徴とする、請求の範囲5に記載の発現ベクター。
9. 請求の範囲1、2、3又は4に記載の核酸配列によりコードされる蛋白質又はペプチドを発現するように形質転換された宿主細胞。
10. 日本杉花粉アレルゲン Cry j I の全体又は一部をコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。
11. 少なくとも1個のその該フラグメントが抗原性フラグメントであることを特徴とする、請求の範囲16に記載の蛋白質組成物。
12. 化学的に合成された日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。
13. 該 Cry j I が配列番号: 1のアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求の範囲16又は18に記載の蛋白質組成物。
14. 日本杉花粉からのアレルゲンの単離抗原性フラグメント。
15. 日本杉花粉からの該アレルゲンが Cry j I であることを特徴とする、請求の範囲20に記載の抗原性フラグメント。
16. 該抗原性フラグメントが少なくとも1個のT細胞エпитープを含むことを特徴とする、請求の範囲20又は21に記載の抗原性フラグメント。
17. 該抗原性フラグメントが最小の免疫グロブリンE賦活性を有することを特徴とする、請求の範囲22に記載の抗原性フラグメント。
18. 該抗原性フラグメントが日本杉花粉に特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、又は該免疫グロブリンEへのフラグメントの結合が起こる場合、そのような結合は肥満細胞又は好塩基性細胞からヒスタミンを放出させないことを特徴とする、請求の範囲22に記載の抗原性フラグメント。
19. 該抗原性フラグメントが、精製された本来の日本杉花粉アレ

ルゲンの宿主細胞。

11. 請求の範囲1、2、3又は4に記載の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のその抗原性フラグメント。

12. 該日本杉花粉アレルゲンが日本杉花粉に関して特異的な免疫グロブリンIgEと結合しないか、又は該免疫グロブリンEへの日本杉花粉アレルゲンの結合が起こる場合、そのような結合が肥満細胞又は好塩基性細胞からのヒスタミンの放出を生じないことを特徴とする、請求の範囲11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。

13. 該日本杉花粉アレルゲンが、精製された本来の日本杉花粉アレルゲンが免疫グロブリンEに結合する場合より実質的に低い程度で該免疫グロブリンEに結合することを特徴とする、請求の範囲11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。

14. 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする、請求の範囲11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

15. a) 日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又はそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞を、該日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む細胞及び培地の混合物の生産に適した培地中で培養し、

b) 該混合物を精製して実質的に純粋な日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントを生産する段階を含む、日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントの生産法。

ゲンが免疫グロブリンEに結合する場合より実質的に低い程度で該免疫グロブリンEに結合することを特徴とする、請求の範囲20に記載の抗原性フラグメント。

26. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが、それを投与した日本杉花粉感受性患者において、日本杉花粉に対するアレルギー応答を改変することができることを特徴とする、請求の範囲11、20、21又は22に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。

27. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが患者の日本杉花粉アレルゲンに対するB細胞応答、患者の日本杉花粉抗原に対するT細胞応答、又は患者の日本杉花粉アレルゲンに対するB細胞応答とT細胞応答の両方を改変することができることを特徴とする、請求の範囲26に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。

28. 請求の範囲20に記載の日本杉花粉アレルゲンの単離抗原性フラグメントをコードする核酸配列。

29. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルゲンに対する患者のアレルギー応答を低下させる、改変日本杉花粉アレルゲン。

30. 該改変日本杉花粉アレルゲンが改変 Cry j I 蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲29に記載の改変日本杉花粉蛋白質アレルゲン。

31. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルゲンに対する患者のアレルギー応答を低下させる、日本杉花粉アレルゲンの少なくとも1個の改変フラグメント。

32. 少なくとも1個の該改変フラグメントが Cry j I 蛋白質の改変フラグメントであることを特徴とする、請求の範囲31に記載の

少なくとも1個の改変フラグメント。

33. Cry j 1 又はそのフラグメントに免疫学的に関連する単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

34. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントが Cry j 1 又はそのフラグメントに特異的な抗体と結合することを特徴とする、請求の範囲33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

35. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントが Cry j 1 又はそのフラグメントに特異的なT細胞を誘活できることを特徴とする、請求の範囲33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

36. 精製日本杉花粉アレルゲン Cry j 1 又は少なくとも1個のそのフラグメント、及び製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む、治療組成物。

37. Cry j 1 が配列番号: 1のアミノ酸1-353の配列を有することを特徴とする、請求の範囲36に記載の治療組成物。

38. 哺乳類に治療的有効量の請求の範囲16又は18に記載の該蛋白質組成物を投与することを含む、日本杉花粉アレルゲン又は日本杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応性のアレルゲンに感受性の哺乳類において、該アレルゲンに対する感受性を処置する方法。

39. 例えば日本杉花粉アレルゲン又は日本杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲンに対する患者の感受性の処置など治療において用いるための請求の範囲16又は18に記載の蛋白質組成物。

40. 哺乳類から得た血液試料を、請求の範囲1に記載の核酸配列を

用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲン又はこの抗原性フラグメントと、血液成分と蛋白質又はそのフラグメントの結合に適した条件下で合わせ、結合が起こる程度を決定する段階を含む、哺乳類における日本杉花粉アレルゲンに対する感受性の検出法。

41. 結合が起こる程度をT細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能、蛋白質又はそのフラグメントの血液中に存在する抗体との結合、又はそれらの組み合わせの評価により決定することを特徴とする、請求の範囲40に記載の方法。

42. 請求の範囲1に記載の核酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲン Cry j 1 又はその抗原性フラグメントを哺乳類中でアレルギー応答を起こすのに十分な量で該哺乳類に投与し、該患者において該日本杉花粉アレルゲン又はその抗原性フラグメントに対するアレルギー応答が起こるかどうかを決定する段階を含む、日本杉花粉アレルゲンに対する哺乳類の感受性の検出法。

43. 日本杉花粉アレルゲン Cry j 1 又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントと特異的に反応性のモノクローナル抗体。

明 細 書

日本杉花粉からのアレルゲン性蛋白質及びペプチド

発明の背景

人口の約10%を成す遺伝的に疾病素質を有する個体は、彼らがさらされる多様な環境的源からの抗原に過敏性(アレルギー性)となる。即時及び/又は遅延型の過敏性を誘起する抗原はアレルゲンとして既知である。(King, T. P., Adv. Immunol. 23: 77-105 (1976))。花粉症、喘息及びじんましの症状を誘起するアナフィラキシー又はアトピーは即時型アレルギーの1つの形態である。それは、芝、木、雑草、動物のふけ、昆虫、食物、薬剤及び化学品の製品などの多様なアトピー性アレルゲンにより起こり得る。

アトピー性アレルギーに付随する抗体は主に免疫グロブリンのIgEの種類に属する。IgEは肥満細胞及び好塩基球に結合する。肥満細胞又は好塩基球と結合したIgEと特異的なアレルゲンが組み合わさると、IgEが細胞表面上で架橋し、IgE-抗原相互作用の生理学的効果を生ずる。これらの生理学的効果には他の物質の中でもヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、好酸球及び/又はロイコトリエンに関する化学伝達因子、C4、D4及びE4の放出が含まれ、それは長期間の気管支平滑筋の収縮を起こす(Hood, L. E. et al. Immunology (2nd ed.), The Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc. (1984))。放出されたこれらの物質は、IgEと特定のアレルゲンの組み合わせにより起こるアレルギー症状を生ずる媒介者である。アレルゲンの効果はそれらを

通じて現れる。それらの効果は抗原が体に入る経路及び肥満細胞又は好塩基球上にIgEが沈着するパターンに依存して全身的又は局所的性質であり得る。局所的現れは一般にアレルゲンが体に入った位置の上皮表面に起こる。全身的効果にはアナフィラキシー(アナフィラキシーショック)が含まれ、それは循環(血管内)抗原へのIgE-好塩基球応答の結果である。

日本杉(Sugi: クリプトメリア ジャポニカ(Cryptomeria japonica))花粉症は日本における最も重大なアレルギー疾患の1つである。この疾患にかかる患者の数は増加しており、いくつかの地域では人口の10%より多くが罹患している。日本杉花粉抽出物を投与してアレルゲンに対して脱感作することによる日本杉花粉症の処置が試みられた。しかし日本杉花粉抽出物を用いた脱感作は、高投与量を用いるとアナフィラキシーを誘引することがあり、アナフィラキシーを避けるために低投与量を用いると抽出物に対する耐性を確立するために処置を数年続けなければならないという欠点を有する。

日本杉花粉からの主要アレルゲンが精製され、スギ塩基性蛋白質(Sugi basic protein) (SBP) 又は Cry j 1 と命名された。この蛋白質は分子量が41-50 kDaでありpIが8.8の塩基性蛋白質であると報告されている。アレルゲンには多数のイソ型があると思われ、それは一部には異なるグリコシル化によると思われる(Yasueda et al. (1983) J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77-86; 及び Tanila et al. (1988) FEBS Letters. 239: 329-332)。 Cry j 1 のN-末端の最初の20個のアミノ

酸の配列及び16個の内部アミノ酸配列が決定された(Tanai et al. 同上)。

日本杉花粉からのCry j 1として知られる分子量が約37 kDaの第2のアレルゲンも報告された(Sakaguchi et al. (1990) Allergy 45:309-312)。このアレルゲンはCry j 1との免疫学的交差反応性を持たないことが見いだされた。日本杉花粉症に罹ったほとんどの患者はCry j 1及びCry j 11の両方に対するIgE抗体を有するが、何人かの患者からの血清はCry j 1又はCry j 11のみと反応することが見いだされた。

低投量量の日本杉花粉抽出物を用いた日本杉花粉症患者の脱感作の他に、1990年7月3日にMatsubashi et al. に与えられた米国特許第4,939,239号は日本杉花粉アレルゲンに共有結合したサッカリドを含む、日本杉花粉に感受性の患者の脱感作のための脱感作薬を開示している。この脱感作薬はIgG及びIgM抗体の生産を強化するが、アレルゲンに特異的でアナフィラキシー及びアレルギーを誘うIgE抗体の生産を減少させると報告されている。脱感作薬に用いられるアレルゲンはAsp-Asn-Pro-Ile-Asp-Ser-X-Trp-Arg-Gly-Asp-Ser-Asn-Trp-Ala-Gln-Asn-Arg-Met-Lys-のNH₂-末端アミノ酸配列を有し、ここでXはSer、Cys、Thr又はHisである(配列番号:1)であることが好ましい。さらにUsui et al. (1990) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91:74-79はスギ塩基性蛋白質(即ちCry

ya orientalis)及びカマエシバリス オブツサ(Cha maecyparis obtusa)。

日本杉花粉アレルゲンが注目されたにもかかわらず、人々に与える悪影響を担うアレルゲンの定義又は特性化は完全から程遠い。現在の脱感作治療は、高投量量の花粉抽出物を投与した場合のアナフィラキシーの危険、又は低投量量の花粉抽出物を投与した場合の長い脱感作期間を伴う花粉抽出物を用いた処置を含む。

発明の概略

本発明はクブトメリア ジャポニカ花粉主要アレルゲンCry j 1及びそのフラグメントをコードする核酸配列を提示する。本発明は、Cry j 1又は少なくとも1個のそのフラグメントをコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製Cry j 1及び少なくとも1個のそのフラグメントならびに合成的に製造されたCry j 1のフラグメントも提示する。本明細書で用いられる場合、Cry j 1の全アミノ酸配列をコードする核酸配列のフラグメントは、Cry j 1及び/又は成熟Cry j 1の全アミノ酸配列をコードする核酸配列より少量の塩基を有する核酸配列を言う。Cry j 1及びそのフラグメントは日本杉花粉症の診断、処置及び予防に有用である。本発明は添付する請求の範囲にさらに特定して記載され、以下の説明中の好ましい態様に記載されている。

図面の簡単な説明

図1aは、10mMの酢酸ナトリウム(pH5.0)及び0.15MのNaClで平衡化したSuperdex75(2.6×60cm)上でアフィニティー精製したCry j 1のグラフ図である。

j 1) - プルラン複合体がアルテュス反応を誘引する能力は顯著に低下し、本来のスギ塩基性蛋白質の約1,000倍低いと報告し、スギ塩基性蛋白質-プルラン複合体は杉花粉症に対する脱感作治療のための優れた候補であると示唆した。

クブトメリア ジャポニカ中で見いだされたCry j 1アレルゲンは、クブレス スェムベルビレンス(Cupressus sempervirens)を含む他の種の木からの花粉中のアレルゲンと交差反応性であることも見いだされた。Panzani et al (Annals of Allergy 57:26-30 (1986))は、皮膚テスト、RAST及びRAST阻害においてクブレス スェムベルビレンスとクブトメリア ジャポニカの花中のアレルゲンの間に交差反応性が検出されたことを報告した。山杉(Mountain Cedar) (ジュニベルス サビノイデス(Juniperus sabinooides))から単離された50kDaのアレルゲンはNH₂-末端配列AspAsnProIleAsp(配列番号:25)を有し(Gross et al. (1978) Scand. J. Immunol. 8:437-441)、それはCry j 1アレルゲンのNH₂-末端の最初の5個のアミノ酸と同一の配列である。Cry j 1アレルゲンは以下の種の木ともアレルゲン的に交差反応性であることが見いだされた:クブレス アリゾニカ(Cupressus arizonica)、クブレス マクロカルパ(Cupressus macrocarpa)、ジュニベルス ビルギニアナ(Juniperus virginiana)、ジュニベルス コムニス(Juniperus communis)、ツヤ オリエンタリス(Thu

図1bは、図1aに示されている主ピークからの面分のSDS-PAGE(12.5%)分析を示す。

図2は、SDS-PAGEにより分離され、mAb CBF2を用いて精製された本来の精製Cry j 1蛋白質のイソ型のウェスタンブロットを示す。

図3は、15人のアレルギー性患者のプールからの血漿を用いて精製した本来のCry j 1の異なる精製面分のアレルギー性血清力価のグラフ図である。

図4a-bは、Cry j 1をコードする2つのオーバーラップクローンJC71.6及びpUC19JC91Aからの混成核酸配列を示す。Cry j 1の完全cDNA配列は1312ヌクレオチドから成り、5'非翻訳配列の66ヌクレオチド、開始メチオニンのコドンで始まる1122ヌクレオチドの読み取り枠、及び3'非翻訳領域を含む。図4a-bはCry j 1の指定アミノ酸配列も示す。

図5aは、塗布抗原(coating antigen)が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)である場合のIgE結合活性の結果のグラフ図である。

図5bは、塗布抗原が精製した本来のCry j 1である場合のIgE結合活性の結果のグラフ図である。

図6は、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)である場合の、15人の患者からプールしたヒト血漿(PHP)を用いた競争的ELISA(competition ELISA)の結果のグラフ図である。

図7は、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)で

あり、競争抗原が精製した本来の Cry j 1 である場合、各患者（患者番号により示す）からの血液を用いた競争的 ELISA の結果のグラフ図である。

図 8 a は、塗布抗原が日本杉花粉からの可溶性花粉抽出物（SPE）である場合、7 人の各患者（患者番号により示す）からの血液を用いた直接結合 ELISA から結果のグラフ図である。

図 8 b は、塗布抗原が還元剤 DTT の存在下で煮沸することにより変性させた変性可溶性花粉抽出物である場合、7 人の各患者（患者番号により示す）からの血液を用いた直接結合 ELISA から結果のグラフ図である。

図 9 は、ウェルに組み替え Cry j 1 (r Cry j 1) を塗布し、各患者につき IgE 結合を分析した直接 ELISA のグラフ図である。

図 10 a は、ウェルに CBF2 (IgG) mAb を塗布し、食の抗原標準として PBS を用い、抗原が精製組み替え Cry j 1 である場合、15 人の患者からブールしたヒト血清を用いた捕獲 ELISA (capture ELISA) の結果のグラフ図である。

図 10 b は、ウェルに 20 μg/ml の CBF2 (IgG) を塗布し、食の抗原標準として PBS を用い、抗原が精製組み替え Cry j 1 である場合、ウサギ抗-Amb a 1 及び I I を用いた、捕獲 ELISA の結果のグラフ図である。

図 11 は、添加抗原として日本杉花粉からの SPE、精製した本来の Cry j 1 及び組み替え Cry j 1 を用い、1 人の日本杉花粉アレルギー患者につき行ったヒスタミン放出分析のグラフ図である。

が観察される。例えば配列番号：1 のアミノ酸 38、51 及び 74 をコードするコドンにおける 1 個の独立したヌクレオチド置換（それぞれ GAA に対する GGA、GCG に対する GTC 及び GAG に対する GGG）はこれらの部位におけるアミノ酸多型性（それぞれ E に対する G、A に対する V 及び E に対する G）を生ずる。さらに日本で収集されたクリプトメリア ジャポニカ花粉から誘導された 1 箇の cDNA クローン中に 1 箇のヌクレオチド置換が検出された。配列番号：1 のアミノ酸 60 のコドンにおけるこの置換（CAT に対する TAT）は、この部位におけるアミノ酸多型性（H に対する Y）を生じ得る。さらに別のサイレントヌクレオチド置換が検出された。さらに別の配列多型性があることが予想され、各クリプトメリア ジャポニカ植物の間で Cry j 1 をコードする核酸配列の 1 箇又はそれより多いヌクレオチド（最高ヌクレオチドの約 1%）が自然の対立遺伝子の変動により変化することは、当該技術における熟練者にはわかるであろう。そのようなヌクレオチドの変化及びその結果生ずるアミノ酸多型性のいずれも、及びすべてが本発明の範囲内である。さらに Cry j 1 のファミリーメンバーが 1 箇か又はそれ以上あるであろう。そのようなファミリーメンバーは、Cry j 1 と機能及びアミノ酸配列が関連しているが別の遺伝子座の遺伝子によりコードされる蛋白質として定義される。

Cry j 1 のフラグメントをコードする核酸配列のフラグメントも本発明の範囲内である。本発明の範囲内のフラグメントには哺乳類、特にヒトにおける免疫応答、例えば最小量の IgE の刺激、IgE の結合、IgG 及び IgM 抗体の生産の誘起、又は増殖などの T 細胞応答及び/又はリンホカイン分泌及び/又は T 細胞エネルギーの誘導などを引

起す、Cry j 1 の一部をコードするフラグメントが含まれる。前記の Cry j 1 のフラグメントは本明細書に於いて抗原性フラグメントと呼ばれる。本発明の範囲内のフラグメントには、Cry j 1 と交差反応性のアレルギーの検出のためのスクリーニング薬で用いられる他の植物種からの核酸とハイブリッド形成することができるフラグメントも含まれる。本明細書中で用いられる場合、Cry j 1 をコードする核酸配列のフラグメントは、Cry j 1 及び/又は成熟 Cry j 1 の全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列より塩基の数が少ないヌクレオチド配列を言う。一般に Cry j 1 のフラグメントをコードする核酸配列は成熟蛋白質をコードする塩基から選ばれるが、ある場合にはフラグメントのすべて又は一部を本発明の核酸配列のリーダー配列部分から選ぶのが望ましい。本発明の核酸配列はリンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位及び Cry j 1 又はそのフラグメントのクローニング、発現あるいは精製に有用な他の配列も含むことができる。

発明の詳細な説明

本発明は日本杉花粉中で見いだされる主要アレルゲンである Cry j 1 をコードする核酸配列を提示する。Cry j 1 をコードする核酸配列は図 4 a 及び 4 b に示す配列（配列番号：1）を有するのが好ましい。図 4 a 及び 4 b に示す Cry j 1 をコードする核酸配列（配列番号：1）は、塩基 66 から塩基 128 までの 217 アミノ酸のリーダー配列を含む。このリーダー配列は塩基 129 から 1187 までによりコードされる成熟蛋白質から切断される。Cry j 1 の推定アミノ酸配列も図 4 a 及び 4 b に示す（配列番号：2）。本発明の核酸配列は推定分子量が 38.5 kDa であり、pI が 7.8 であり、5 箇の N-結合グリコシル化可能部位を有する蛋白質をコードする。これらのグリコシル化部位を用いると分子量が増加し、成熟蛋白質の pI に影響するであろう。本発明の核酸配列によりコードされる成熟蛋白質に関する推定アミノ酸配列は Tanial et al., 同上により報告された既知の NH₂-末端及び内部アミノ酸配列と同一である。Tanial et al., 同上により報告された Cry j 1 の NH₂-末端は、配列番号：18 に示す配列を有する。Tanial et al., 同上により報告された内部配列は、配列 GluAlaPheAsnValGluAsnGlyAsnAlaThrProGlnLeuThrLys（配列番号：19）を有する。本発明の核酸配列には配列多型性

を有する。本発明の核酸配列は、Cry j 1 の一部をコードするフラグメントが含まれる。前記の Cry j 1 のフラグメントは本明細書に於いて抗原性フラグメントと呼ばれる。本発明の範囲内のフラグメントには、Cry j 1 と交差反応性のアレルギーの検出のためのスクリーニング薬で用いられる他の植物種からの核酸とハイブリッド形成することができるフラグメントも含まれる。本明細書中で用いられる場合、Cry j 1 をコードする核酸配列のフラグメントは、Cry j 1 及び/又は成熟 Cry j 1 の全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列より塩基の数が少ないヌクレオチド配列を言う。一般に Cry j 1 のフラグメントをコードする核酸配列は成熟蛋白質をコードする塩基から選ばれるが、ある場合にはフラグメントのすべて又は一部を本発明の核酸配列のリーダー配列部分から選ぶのが望ましい。本発明の核酸配列はリンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位及び Cry j 1 又はそのフラグメントのクローニング、発現あるいは精製に有用な他の配列も含むことができる。

Cry j 1 をコードする核酸配列はクリプトメリア ジャポニカ植物から得ることができる。しかし出願人等は商業的に入手可能なクリプトメリア ジャポニカ花粉から Cry j 1 をコードする mRNA を得られないことを見いだした。花粉から mRNA を得られないのは、商業的に入手可能な花粉の保存又は輸送に伴う問題のためであろう。出願人等は、新しい花粉及び雄球果（staminate cone）が Cry j 1 mRNA の良い供給源であることを見いだした。Cry j 1 をコードする核酸配列はゲノム DNA から得ることもできる。クリプトメリア ジャポニカは周知の杉の種であり、植物材料は野生の、

栽培された又は観葉の植物から得ることができる。Cry 1 Iをコードする核酸配列は本明細書に記載の、又は遺伝子の単離及びクローニングのための他の適した方法を用いて得ることができる。本発明の核酸配列はDNA又はRNAであることができる。

本発明は本発明の核酸配列の発現のための発現ベクター及び形質転換された宿主細胞を提示する。Cry 1 I又は少なくとも1個のそのフラグメントをコードする核酸は、大腸菌などのバクテリア細胞、昆虫細胞（バクウィルス）、酵母又は哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）中で発現することができる。適した発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節要素は、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) に見いだすことができる。他の適した発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現要素は当該技術における熟練者に既知である。哺乳類、酵母又は昆虫細胞における発現は、組み換え体の部分的又は完全なグリコシル化及び膜間あるいは膜内ジスルフィド結合の形成に導く。酵母における発現に適したベクターにはYepSec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6: 229-234); pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943); JRY86 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123) 及びpYES2 (Invitrogen Corporation,

San Diego, CA) が含まれる。これらのベクターは自由に入手可能である。バクウィルス及び哺乳類発現系も入手可能である。例えば昆虫細胞における発現のためにバクウィルスが商業的に入手でき (PharMingen, San Diego, CA)、哺乳類細胞における発現のためにpMSGベクターが商業的に入手できる (Pharmacia, Piscataway, NJ)。

大腸菌における発現の場合、適した発現ベクターには中でもpTRC (Amann et al. (1988) Gene 69: 301-315); pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia); pMAL (N. E. Biolabs, Beverly, MA); pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ); pET-11d (Novagen, Madison, WI) Jameel et al., (1990) J. Virol. 64: 3963-3966; 及びpSEM (Knapp et al., (1990) Bio Techniques 8: 280-281) が含まれる。例えばpTRC及びpET-11dを用いると非融合蛋白質の発現に導く。pMAL、pRIT5、pSEM及びpGEXを用いるとマルトースE結合蛋白質 (pMAL)、プロテインA (pRIT5)、切断 (truncated) β -ガラクトシダーゼ (pSEM) 又はグルタチオン S-トランスフェラーゼ (pGEX) に融合したアレルゲンの発現に導く。Cry 1 I又はそのフラグメントが融合蛋白質として発現される場合、キャリアー蛋白質とCry 1 I又はそのフラグメントの間の融合連結部分に酵素切断部位を導入するのが特に有利である。その後Cry 1 I又はそのフラグメントを酵素部位における

酵素切断、ならびに蛋白質及びペプチドの精製のための従来の方法を用いた生化学的精製により融合蛋白質から回収することができる。適した酵素切断部位には、血液凝固因子Xa又はトロンボリンのための部位が含まれ、それらの切断に関する適した酵素及びプロトコルは、例えばSigma Chemical Company, St. Louis, MO及びN. E. Biolabs, Beverly, MAから商業的に入手できる。異なるベクターは異なるプロモーター領域も有し、構成性発現又は例えばIPTG誘導 (pRIT5, Amann et al., (1988) 同上; pET-11d, Novagen, Madison, WI) あるいは温度誘導 ((pRIT5, Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いた誘導性発現を可能にする。組み換えCry 1 Iを、組み換えにより発現された蛋白質を分解する能力が遠く異なる大腸菌中で発現するのも適している (例えば米国特許第4, 758, 512号明細書)。別の場合、発現される蛋白質のアミノ酸配列に影響を与えないような核酸配列の改変を行い、大腸菌が用いる傾向のあるコドンを用いるのが有利である。

宿主細胞は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション又はエレクトロポレーションなどの従来の方法を用い、本発明の核酸配列を発現するように形質転換することができる。宿主細胞の形質転換のための適した方法は、Sambrook et al. 同上及び他の実験書に見いだすことができる。

本発明の核酸配列は、標準的方法を用いて合成することもできる。

本発明は、日本杉花粉アレルゲンCry 1 I又は少なくとも1個

のそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換した宿主細胞を、該日本杉花粉アレルゲン又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む細胞と培地の混合物を生産するのに適した培地中で培養し、混合物を精製して實質的に純粋な日本杉花粉アレルゲンCry 1 I又は少なくとも1個のそのフラグメントを生産する段階を含む、精製日本杉花粉アレルゲンCry 1 I又は少なくとも1個のそのフラグメントを生産する方法も提示する。Cry 1 I又は少なくとも1個のそのフラグメントをコードするDNAを含む発現ベクターを用いて形質転換した宿主細胞を、宿主細胞に適した培地中で培養する。Cry 1 I蛋白質及びペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動及びCry 1 I又はそのフラグメントに特異的な抗体を用いた免疫精製を含む当該技術においてペプチド及び蛋白質の精製に関して既知の方法を用い、細胞培地、宿主細胞又は両方から精製することができる。単離された、及び精製されたという用語は本明細書で互換的に用いられ、組み換えDNA法を用いて生産された場合は細胞物質又は培地を、あるいは化学的に合成された場合は化学的前駆体又は他の化学品を實質的に含まないペプチド、蛋白質、蛋白質フラグメント及び核酸配列を言う。

本発明の他の特徴として、日本杉花粉アレルゲンCry 1 Iの全体又は一部をコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された、あるいは化学的に合成された日本杉花粉アレルゲンCry 1 I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む組成物、ならびに本発明の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルゲンCry 1 I蛋白質

質又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントを提示する。本発明の好ましい態様の場合、Cry j I 蛋白質は少なくとも成熟 Cry j I 蛋白質をコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産される。

所望の抗原応答を引き出す日本杉花粉からのアレルゲン、好ましくは Cry j I のフラグメント (本文では抗原性フラグメントと呼ぶ) は、例えばそのようなペプチドをコードする本発明の核酸配列の対応するフラグメントから組み替えにより生産された、当該技術における熟練者に既知の方法を用いて化学的に合成された、又はアレルゲンの化学的切断により生産されたペプチドのスクリーニングにより得ることができ、アレルゲンはペプチドのオーバーラップのない所望の長さの断片に任意に分ける、好ましくはペプチドのオーバーラップのない所望の長さのフラグメントに分ける、あるいは好ましくは所望の長さのオーバーラップフラグメントに分けることができる。フラグメントは試験をしてその抗原性を決定する (例えば免疫応答を誘起するフラグメントの能力)。日本杉花粉アレルゲン、例えば Cry j I のフラグメントを治療目的で用いる場合、賦活などのT細胞応答 (すなわち増殖又はリンホカイン分泌) を引き出すことができる、及び/又はT細胞アレルギーを誘起することができる日本杉花粉アレルゲンのフラグメントが特に望ましく、最小IgE賦活活性を有する日本杉花粉のフラグメントも望ましい。さらに治療目的の場合、精製日本杉花粉アレルゲン、例えば Cry j I 及びそのフラグメントは、日本杉花粉に特異的なIgEと結合しない、あるいは本来の精製日本杉花粉アレルゲンがそのようなIgEと結合する場合より実質的に低い程度でそのようなIgEと結合するのが好まし

デルで試験するのが好ましい。蛋白質又はそのフラグメントへのIgE結合の最初のスクリーニングは、実験動物又はヒトのボランティアへの乱切皮膚試験又は皮内試験により、あるいはRAST (ラジオアレルゴソルベント試験 (radioallergosorbent test))、RAST阻害、ELISA分析、ラジオイムノアッセイ (RIA)、又はヒスタミン放出などの試験管内系において行うことができる (実施例7及び8を参照)。

T細胞賦活活性を有し、従って少なくとも1個のT細胞エпитープを含む本発明の抗原性フラグメントは特に望ましい。T細胞エпитープは、アレルギーの臨床的症状に対応する蛋白質アレルゲンへの免疫応答の開始及び持続に関与するものと思われる。これらのT細胞エпитープは、抗原提示細胞の表面の適したHLA分子に結合し、関連するT細胞の下部集団を刺激することによりTヘルパー細胞のレベルで初期の事象を起こすと思われる。これらの事象はT細胞増殖、リンホカイン分泌、局所的炎症反応、部位への追加の免疫細胞の補給、及び抗体の生産に続くB細胞カスケードの活性化に導く。これらの抗体のイソ型の1つであるIgEは基本的にアレルギー症状の発現に重要であり、その生産は分泌されるリンホカインの性質によりTヘルパー細胞のレベルで事象のカスケードの初期に行われる。T細胞エピトープはT細胞レセプターによる認識の基本的要素又は最小単位であり、エピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含む。T細胞エピトープのアミノ酸配列を償しており、蛋白質アレルゲンへのアレルギー応答を改変するアミノ酸配列は本発明の範囲内である。

少なくとも1個のT細胞エピトープを含む、蛋白質アレルゲンから誘

い。精製日本杉花粉アレルゲン又はそのフラグメントがIgEと結合する場合、そのような結合により肥満細胞又は好塩基球から媒介物 (例えばヒスタミン) が放出されないのが好ましい。最小IgE賦活活性は、本来の Cry j I 蛋白質により賦活されるIgE生産の量より少ないIgE賦活活性を言う。

日本杉花粉からの精製蛋白質アレルゲン又はその好ましい抗原性フラグメントは、日本杉花粉感受性患者、又は日本杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲン、例えばクブレス セムベルビレンス又はジュニベルス サビノイデスなど (前記で議論) の花粉からのアレルゲンにアレルギー性の患者に投与すると、日本杉花粉又はそのような交差反応性アレルゲンへの患者のアレルギー応答を改変することができ、好ましくは患者のアレルゲンに対するB細胞応答、T細胞応答又はB細胞及びT細胞応答の両方を改変することができる。本明細書で用いられる日本杉花粉アレルゲンに感受性の患者のアレルギー応答の改変は、標準的臨床法により決定されるアレルゲンに対する非応答性又は症状の軽減として定義することができる (例えばVarney et al. *British Medical Journal*, 302:265-269 (1990) を参照)。

精製 Cry j I 蛋白質又はそのフラグメントは、日本杉花粉症の哺乳類モデル、例えばTamura et al. (1986) *Microbiol. Immunol.* 30:883-896又は米国特許第4,939,239号明細書に開示されているマウスのモデル、あるいはChiba et al. (1990) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 93:83-88に開示されている霊長類のモ

導された本発明の精製蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性フラグメントに患者を暴露すると、適したT細胞下部集団を耐性又はアレルギー性とすることができ、それらは蛋白質アレルゲンに非応答性となり、そのような暴露における免疫応答の賦活に関与しなくなる。さらに少なくとも1個のT細胞エピトープを含む本発明の蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性フラグメントの投与は、天然に存在する蛋白質アレルゲン又はその一部への暴露と比較してリンホカイン分泌プロファイルを改変することができる (例えばIL-4の減少及び/又はIL-2の増加を起こす)。さらにそのような抗原性フラグメント又は蛋白質アレルゲンへの暴露は、通常アレルゲンへの応答に関与するT細胞下部集団に影響し、これらのT細胞を通常アレルゲンに暴露される部位 (例えば鼻粘膜、皮膚及び肺) から遠ざけ、フラグメント又は蛋白質アレルゲンの治療的投与の部位に引っ張る。このT細胞下部集団の再分布は、アレルゲンに通常暴露される部位における通常の免疫応答を賦活する患者の免疫系の能力を改善又は低下させ、アレルギー症状を軽減することができる。

精製 Cry j I 蛋白質及びそれから誘導されたフラグメント又は一部 (ペプチド) は、日本杉花粉アレルゲン又は交差反応性蛋白質アレルゲンへのアレルギー反応の診断、処置及び予防の方法において用いることができる。かくして本発明は、Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメントを免疫するように形質転換された宿主細胞において生産された精製日本杉花粉アレルゲン Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメント、ならびに製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む治療組成物を提示する。本発明の治療組成物は合成により製造された Cry j I 又は少なくとも1個のそのフラグメント、ならびに

製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含むこともできる。本発明の治療組成物の脱感作すべき患者への投与は、既知の方法を用いて行うことができる。Cry j I 蛋白質又は少なくとも1個のそのフラグメントは、例えば適した希釈剤、担体及び/又はアジュバントと組み合わせて患者に投与することができる。製薬学的に許容し得る希釈剤には食塩水及び緩衝水溶液が含まれる。製薬学的に許容し得る担体にはポリエチレングリコール (Wie et al. (1981) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 64:84-99) 及びリボソーム (Strejan et al. (1984) J. Microimmunol 7:27) が含まれる。T細胞アレルギー誘導の目的の場合、治療組成物は非免疫原形態で、例えばアジュバントを含まない形態で投与するのが好ましい。そのような組成物は一般に注射(皮下、静脈内など)、経口投与、吸入、経皮適用又は直腸投与により投与される。本発明の治療組成物は、日本杉花粉感受性の患者に、日本杉花粉に対する患者の感受性の低下(すなわちアレルギー応答の低下)に有効な投与量及び期間で投与される。治療組成物の有効量は、患者の日本杉花粉に対する感受性の程度、患者の年齢、性別及び体重ならびにCry j I 蛋白質又はそのフラグメントが患者において抗原応答を引き出す能力などの因子によって変わるであろう。

Cry j I cDNA (又はそれが転写される基のmRNA) あるいはその一部を用いていずれの種類又は型の植物においても類似の配列を同定することができ、従ってCry j I cDNA又はmRNAあるいはその一部とハイブリッド形成するのに十分な相溶性を有する配列、例えばクブレス スムベルビレンス、ジュニベルス サビノイ

モノクローナル抗体はアレルギー抽出物の標準化に用いることができる。

本発明のペプチド及び蛋白質を用い、一貫性があり、十分に定義された生物学的活性を有する組成物を製造し、治療目的で(例えば日本杉感受性患者のそのような木の花粉へのアレルギー応答を改変するために)投与することができる。そのようなペプチド又は蛋白質の投与は、例えばCry j I アレルゲンへのB細胞応答、Cry j I アレルゲンへのT細胞応答又は両応答を改変することができる。精製ペプチドはクリプトメリア ジャポニカアレルギーの免疫治療の機構の研究及び免疫治療で有用な改変誘導体又は類似体の設計にも用いることができる。

他の研究者による研究により、高投与量のアレルギーが一般に最良の結果を与える(すなわち症状の最良の軽減)ことが示された。しかし多くの人々はアレルギーに対するアレルギー反応のために高投与量のアレルギーに耐えることができない。天然に存在する対応するアレルギーと同一又は強化された治療性を有するが副作用の減少した(特にアナフィラキシー反応)改変ペプチド又は改変アレルギーが生産されるように、天然に存在するアレルギーの改変を設計することができる。これらは例えば本発明の蛋白質又はペプチド(例えばCry j I のアミノ酸配列の全体又は一部を有するもの)、あるいは改変蛋白質又はペプチドあるいは蛋白質又はペプチド類似体であることができる。溶解度の向上、治療又は予防効率、あるいは安定性の強化(例えば生体内における保存寿命及び生体内における蛋白質分解への抵抗性)の目的で本発明の蛋白質又はペプチドの構造を改変することができる。免疫原性の改変及び/又はアレルギー性の低下のためにアミノ酸置換、欠失又は付加などによってアミノ酸配列が変えられた、又は同目的のために成分が加えられた

デスなどのアレルギーからのDNAを低塩濃度条件下で同定又は“引き出す(pull out)”ことができる。十分な相溶性(一般に40%より多い)を有する配列を選び、本明細書に記載の方法を用いてさらに評価することができる。代わりに高塩濃度条件下で用いることができる。この方法の場合、本発明のDNAを用いて他の種類の植物、好ましくは関連する科、属又は種、例えばジュニベルス又はクブレスの植物において、日本杉花粉アレルギーCry j I と類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を同定することができ、従って他の種におけるアレルギーを同定することができる。かくして本発明はCry j I のみでなく、本発明のDNAとハイブリッド形成するDNAによりコードされる他のアレルギーも含む。さらに本発明は、例えば抗体交差反応性又はT細胞交差反応性によりCry j I 又はそのフラグメントに免疫学的に関連している単離アレルギー性蛋白質又はそのフラグメントを含む、抗体交差反応性の場合単離アレルギー性蛋白質又はそのフラグメントは本発明の蛋白質及びペプチドに特異的な抗体と結合することができ、T細胞交差反応性の場合単離アレルギー性蛋白質又はそのフラグメントは本発明の蛋白質又はペプチドに特異的なT細胞を賦活することができる。

本発明のcDNAによりコードされる蛋白質又はペプチドは、例えば“精製”アレルギーとして用いることができる。そのような精製アレルギーは日本杉花粉症の診断及び治療の重要試薬であるアレルギー抽出物の標準化において有用である。さらにCry j I の核酸配列に基づくペプチドを用いることにより、標準的方法を用いて抗ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体を製造することができる。これらの血清又は

改変蛋白質又はペプチドを生産することができる。例えばT細胞エリトープ機能に必須のアミノ酸残基を既知の方法を用いて決定することができる(例えば各残基の置換及びT細胞活性の存在又は不在の決定)。必須であることが示された残基を改変することができ(例えばその存在がT細胞活性を強化することが示された他のアミノ酸による置換)、同様にT細胞活性に必要でない残基も改変することができる(例えばその挿入がT細胞活性を強化するが関連するMHCへの結合を減少させない他のアミノ酸による置換により)。蛋白質又はペプチドの改変の他の例は、システイン残基を、好ましくはアラニン、セリン、トレオニン、ロイシン又はグルタミン酸で置換してジスルフィド結合による二量体を最低にすることである。本発明のペプチドの改変の他の例は、アミノ酸側鎖の化学的修飾又はペプチドの環化による。

安定性及び/又は反応性の強化のために、本発明の蛋白質又はペプチドを改変し、自然の対立遺伝子座から生ずる蛋白質アレルギーのアミノ酸配列における多型性を1倍又はそれより多く挿入することもできる。さらにD-アミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸類似体を置換又は付加して本発明の範囲内の改変蛋白質又はペプチドを製造することができる。さらに本発明の蛋白質又はペプチドをA. Sehon及び共同研究者等(Wie et al. 同上)のポリエチレングリコール(PEG)法を用いて改変し、PEGと複合した(conjugate)蛋白質又はペプチドを製造することができる。さらに本発明の蛋白質又はペプチドの化学合成の間にPEGを加えることができる。蛋白質又はペプチドあるいはその一部の改変には還元/アルキル化(Tarr 於: Method of Protein Microcharac

terization, J. E. Silver ed. Humana Press, Clifton, NJ, pp155-194 (1986)) ;アシル化 (Tarr, 同上) ;通した抗体への化学的カップリング (Mishell and Shiigi, eds. Selected Methods in Cellular Immunology, WH Freeman, San Francisco, CA (1980)) ;米国特許第4,939,239号明細書;又は種やかなホルマリン処理 (Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology, 41:199-215 (1971)) も含まれる。

本発明の蛋白質又はペプチドの精製を容易にし、おそらく溶解度を向上させるために、ペプチド主鎖にリポーター基を付加することができる。例えばポリヒスチジンをペプチドに付加し、固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー上でペプチドを精製することができる (Hochuli, E. et al., Bio/Technology, 6:1321-1325 (1988))。さらに必要ならリポーター基とペプチドのアミノ酸配列の間に特異的エンドプロテアーゼ切断部位を導入し、無関係な配列を含まないペプチドの単離を容易にすることができる。蛋白質抗原に対する患者の脱感作に成功するために、ペプチドに官能基を加えるか又はペプチド中に疎水性T細胞エピトープあるいは疎水性エピトープを有する領域を含まない、あるいは蛋白質又はペプチド中に疎水性領域を含まないことにより、蛋白質又はペプチドの溶解度を上げることが必要である。

おそらくペプチド内のT細胞エピトープの適した抗原プロセッシングを

他の方法で) ペプチドを生産し、日本杉花粉感受性患者におけるB細胞及び/又はT細胞応答に影響するそれらの能力に関して調べ、細胞により認識されるエピトープを含む適したペプチドを選択することにより行うことができる。エピトープにつき言及すると、エピトープはレセプター、特に免疫グロブリン、組織適合性抗原及びT細胞レセプターによる認識の基本的要素又は最小単位であり、エピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含む。エピトープのアミノ酸配列を模してあり、Cry j 1 に対するアレルギー応答を調節して下げることができるアミノ酸配列も用いることができる。

ここで、日本杉花粉アレルギーが日本杉花粉感受性患者においてアレルギー反応を誘起する能力を遮断又は阻害することができる試薬又は薬剤を設計することも可能である。そのような試薬は例えば関連する抗原 Cry j 1 IgEに結合し、かくしてIgE-アレルギー結合及びその後の肥満細胞の脱顆粒を妨げるように設計することができる。別の場合、そのような試薬は免疫系の細胞成分と結合し、ク립トメリアジャポニカ花粉アレルギーへのアレルギー応答の抑制又は脱感作を生ずることができる。この例は、日本杉花粉へのアレルギー応答を抑制するための本発明のcDNA/蛋白質構造に基づく適したB及びT細胞エピトープペプチド、又はその改変物の利用であるがこれらに限られるわけではない。これは日本杉花粉感受性患者からの血液成分を用いた試験管内研究においてB及びT細胞機能に影響を与えるB及びT細胞エピトープペプチドの構造を定義することにより行うことができる。

本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体は、日本杉花粉症の検出及び診断に用いることもできる。例えばこれは、日本杉花粉に対する感受性を評

助けるために、それぞれ少なくとも1個のT細胞エピトープを含む領域間に規定プロテアーゼ感受性部位を、組み替え又は合成により操作することができる。例えばKK又はRRなどの常電アミノ酸対を、ペプチドの組み替え精製中にペプチド内の領域間を導入することができる。得られるペプチドはカテプシン及び/又は他のトリプシン様酵素切断に感受性となり、1個又はそれより多いT細胞エピトープを含むペプチドの部分を生産することができる。さらにそのような常電アミノ酸対はペプチドの溶解度を向上させる。

本発明のペプチド又は蛋白質 (例えば Cry j 1 又はそのフラグメント) をコードするDNAの特定部位の突然変異誘発を用い、当該技術において既知の方法によりペプチド又は蛋白質の構造を改変することができる。そのような方法には中でも縮重オリゴヌクレオチドを用いたPCR (Ho et al., Gene, 77:51-59 (1989)) 又は突然変異遺伝子の全合成 (Hostomsky, Z. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 161:1056-1063 (1989)) が含まれる。バクテリア発現の強化のために、上記の方法を他の方法と組み合わせ用い、本発明の蛋白質又はペプチドをコードするDNA構築物における真核コドンで大腸菌、酵母、哺乳類細胞又は他の真核細胞で用いられる傾向のあるコドンに換えることができる。

現在利用できる構造に関する情報を用い、日本杉花粉感受性患者に十分な量で投与すると日本杉花粉に対する患者のアレルギー応答を変えらるであろう Cry j 1 ペプチドを設計することができる。これは例えば Cry j 1 の構造を調べ、(発現系を用いて、合成により、又は

抽出しなければならない患者から得た血液又は血液生成物 (blood products) を Cry j 1 の単離抗原性ペプチド又は単離 Cry j 1 蛋白質と、血液中の成分 (例えば抗体、T細胞、B細胞) とペプチド又は蛋白質の結合に適した条件下で合わせ、そのような結合が起こった程度を決定することにより行うことができる。

本発明は、Cry j 1 の全体又は少なくとも1個のフラグメントをコードするDNAを含む発現ベクターを含む宿主細胞を、Cry j 1 又は少なくとも1個のフラグメントの発現に適した条件下で培養することを含む、Cry j 1 又はそのフラグメントの製造法も提示する。発現された生成物をその後既知の方法を用いて回収する。別の場合 Cry j 1 又はそのフラグメントを既知の機械的又は化学的方法を用いて合成することができる。

本発明のいずれの態様において用いられるDNAも、本明細書に記載の要領で得られるcDNAであることができ、又は別の場合本明細書に示されている配列の全体又は一部を有するいずれのオリゴヌクレオチド配列、又はそれらの機能的同等物であることもできる。そのようなオリゴヌクレオチド配列は、既知の方法を用いて化学的又は酵素的に製造することができる。オリゴヌクレオチド配列の機能的同等物は、1) 配列番号: 1の配列 (又は対応する配列部分) 又はそのフラグメントがハイブリッド形成する相補的オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することができる配列、又は2) 配列番号: 1に相補的な配列 (又は対応する配列部分) 及び/又は3) 配列番号: 1の配列 (又は対応する配列部分) によりコードされる生成物と同一の機能的特性を有する生成物 (例えばポリペプチド又はペプチド) をコードする配列である。機能的同等物が

1つ又は両方の基準を満たしていなければならないかどうかは、その用途に依存する（例えばオリゴブロープとしてのみ用いる場合、第1又は第2の基準のみを満たすことが必要であり、Cry j I アレルゲンを製造するのに用いる場合、第3の基準のみを満たすことが必要である）。

本発明を以下の実施例によりさらに例示するが、これらは制限ではない。

実施例1

本来の日本杉花粉アレルゲン (Cry j I) の精製

以下は、主要アレルゲンCry j I を本来の形態で生化学的に精製するために行った研究の説明である。精製は、公開されている方法からの修正法である (Yasuda et al., J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77, 1983)。

日本から得た100gの日本杉花粉 (Hollister-Stier, Spokane, WA) を1Lのジエチルエーテル中で3回脱脂し、脱脂の後に花粉を集め、真空中でエーテルを乾燥した。

脱脂した花粉を、最終濃度で50mMのトリス-HCl、pH 7.8、0.2MのNaCl及びプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター (2μg/ml)、ロイペプチン (1μg/ml)、ペプスタチンA (1μg/ml) 及びフェニルメチルスルホニルフルオリド (0.17mg/ml) を含む2Lの抽出緩衝液中にて4℃で終夜抽出した。不溶性物質を1.2Lの抽出緩衝液を用い、4℃で終夜再抽出し、両抽出物を併せ、抽出緩衝液で平衡化したWhatman DE-52 DEAEセルロース (乾燥重量200g) を用いたパッチ吸着により脱

8列)。銀染色を用いたSDS-PAGEにより分析してCry j I は3バンドに分別された (図1b)。図1bに示す通り、図1aに示されている主ピークからの面分のSDS-PAGE (12.5%) 分析は、還元条件下で行った。ゲルを、Bio-Radからの銀染色キットを用いて銀染色した。各列の試料は以下の通りである：1列、オボアルブミン (43,000kD)、カルボニクアンヒドラーゼ (29,000kD) 及びα-ラクトグロブリン (18,400kD) を含む予備染色標準蛋白質 (Gibco BRL)；2列、面分36；3列、面分37；4列、面分38；5列、面分39；6列、面分41；7列、面分43；及び8列、面分44。すべての面分は、図1aに示す。

これらの蛋白質を、マウスモノクローナル抗体CBF2を用いたウェスタンブロットによっても分析した (図2)。図2に示す通り、図1で示すSuperdex 75から精製した面分36 (1列)、面分39 (2列) 及び面分43 (3列) のアリコートはSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース上にエレクトロブロッティングし、mAb CBF2を用いて精査した。第2抗体としてビオチン化 (biotinylated) ヒツジ抗マウスIgを用い、結合抗体を¹²⁵I-ストレプトアビジンにより明らかにした。モノクローナルCBF2はDr. D. Klapper (Chapel Hill, N. Carolina) により、ふたつきアレルゲンAmb a Iに対して誘起された。Amb a I及びCry j I 配列の間の相同性の理由で、Amb a Iに対して誘起された多数の抗体をCry j I との反応性に関して調べた。結果は、CBF2がELISA及びウェスタンブロッティングにより検出される通り反応性Cry j I を認識することを示した。

色した。

脱色した材料をその後80%飽和にて硫酸アンモニウム沈澱により分別し (4℃)、それにより低分子量物質の多くが除去された。得られた部分的精製Cry j I はPBS緩衝液中で透析してT細胞研究に用いるか (実施例6を参照)、又は下記の変種でさらに精製した。

濃縮されたCry j I 材料をその後4℃にて、プロテアーゼインヒビターと共に50mMの酢酸Na、pH 5.0に対して透析した。非結合物質 (塩基性蛋白質) をその後、4℃にてプロテアーゼインヒビターを含む10mMの酢酸Na、pH 5.0を用いて平衡化した50mlのカチオン交換カラム (Whatman CM-52) にかけた。Cry j I は0.3M NaClの直線勾配の初期面分で溶離した。濃縮されたCry j I 物質を凍結乾燥し、その後25℃で300mlのSuperdex 75カラム (Pharmacia) 上のFPLCにより10mMの酢酸Na、pH 5.0中で30ml/時間の流量にて精製した。

精製されたCry j I をさらに25℃にて0-1MのNaCl直線勾配を用いたFPLC-S-Sepharose 16/10カラムクロマトグラフィー (Pharmacia) にかけた。主ピークとして溶離したCry j I を第2のゲル透過クロマトグラフィーにかけた。FPLC Superdex 75カラム (2.6×60cm) (Pharmacia, Piscataway, NJ) を、25℃にて30ml/時間の流量で0.15MのNaClを含む10mMの酢酸Na、pH 5.0の下方向への流れで溶離した。図1aはゲル透過上のクロマトグラフィーを示す。Cry j I のみが検出された (図1b、2列から

さらにウェスタンブロッティングは、予想された分子量範囲のCry j I 以外に他のバンドがCBF2により検出されないことも示した (図2)。これらの結果は蛋白質配列決定からの発見と一致した。面分44及び面分39 (図1b) につきN-末端配列決定を行うと、Cry j I 配列のみが検出される。

要するに、花粉抽出物から分子量の異なる3種類のCry j I イソ型が精製された。SDS-PAGEにより算出された分子量は、還元及び非還元条件下の両方で40-35kDの範囲であった。これらのイソ型の等電点は約9.5-8.6であり、平均pIは9.0であった。N-末端の20個のアミノ酸配列はこれらの3つのバンドにおいて同一であり、以前に公報されたCry j I 配列 (Taniai et al., 同上) と同一であった。3個のイソ型は、プールされた15人のアレルギー患者の血漿を用いたCry j I の別の精製細分面分のアレルギー性血清力価において示される通り、すべてモノクローナル抗体CBF2により認識される。それらはすべてアレルギー患者のIgEと結合する (図3)。分子量及び等電点における差は、翻訳後修飾、例えばグリコシル化、リン酸化に一部起因し、あるいは脂質含有率がこれらのイソ型において異なるかもしれない。これらの異なるイソ型がプロテアーゼ分解によるという可能性は、抽出及び精製の間に4種類の異なるプロテアーゼインヒビターが用いられたという事実からありそうではないとは言っても現在除外することはできない。他の可能性は、遺伝子における多型性又はmRNAにおけるスプライシングの変更によるものであるが、cDNAクローニング研究においては1個の主形態のCry j I

I蛋白質が検出されたのみである (実施例4を参照)。

本来の *Cry j I* は組み替え *Cry j I* の精製に用いることができる他の方法は、免疫アフィニティークロマトグラフィーである。この方法は、モノクローナル抗体及び抗原の間の相互作用の特異性の故に非常に選択的な蛋白質精製を与える。*Cry j I*-反応性モノクローナル抗体の製造の目的のために、雄の Balb/c マウスを Jackson Labs から入手した。各マウスを最初にフロイント完全アジュバント中に乳化した 70-100 μ g の精製した本来の *Cry j I* (図 1b に示す通り >99% 純度の低バンド) を用いて腹腔内により免疫化した。最初の注射の 54 日後に、PBS 中の 10 μ g の精製した本来の *Cry j I* をさらに 1 回静脈注射した。3 か後に脾臓を取り出し、骨髓腫系 SP2.0 を用いて記載の通りに (Current Protocols in Immunology, 1991, Coligan et al. eds.) 骨髓腫融合 (myeloma fusion) を行った。細胞を 10% ウシ胎児血清 (Hybrimax)、ヒポキサンチン及びアザセリン中で培養し、ハイブリドーマ細胞のコロニーを含むウェルを抗原-結合 ELISA を用いて抗体生産に関してスクリーニングした。

陽性のウェルからの細胞を、10% ウシ胎児血清 (Hybrimax)、ヒポキサンチン中で 10 分の 3 細胞/ウェルにてクローニングし、陽性のクローンをさらにもう 1 回ヒポキサンチン培地中でサブクローニングした。第 2 及び第 3 のスクリーニングに、捕獲 ELISA (capture ELISA) (実施例 7 を参照) を用いた。この分析は、本来の蛋白質を認識するクローンを選択することができ、従って免疫アフィニティークロマトグラフィーに有用であるという利点を与える。従って mAbs は花

Lenior, NC)、グアニジン抽出の前にクリプトメリア ジャボニカ花粉をアセトンで脱脂しても A_{260} における吸収により決定して RNA は得られなかった。

Sambrook et al., 同上における方法に従った、クリプトメリア ジャボニカ花粉からの RNA の酸フェノール抽出が試みられた。花粉を 4.5 M のグアニジン溶液中で粉砕し、剪断し、2 M の酢酸ナトリウムを加えて酸性化し、水-飽和フェノール及びクロロホルムを用いて抽出した。沈殿の後ペレットを 4 M の塩化リチウムで洗浄し、10 mM トリス/5 mM EDTA/1% SDS 中に再溶解し、クロロホルムで抽出し、NaCl 及び無水エタノールで再沈殿させた。この方法を用いてアンブrosia アルテミシイフォリアの抽出はできたがクリプトメリア ジャボニカ RNA は抽出できなかった。

次に 4 g のクリプトメリア ジャボニカ花粉を 10 ml の抽出緩衝液 (50 mM トリス、pH 9.0、0.2 M NaCl、10 mM 酢酸 Mg 及び 0.1% までジエチルピロカーボネート (DEPC)) 中に懸濁し、ドライアイス上の乳鉢及び乳棒にて粉砕し、1% SDS、10 mM EDTA 及び 0.5% の N-ラウリルサルコシンと共に遠心管に移し、混合物を温フェノールで 5 回抽出した。最後の遠心の後、水相を回収し、2.5 体積の無水エタノールを加え、混合物を 4℃ で終夜インキュベートした。遠心によりペレットを回収し、65℃ に加熱することにより 1 ml の dH_2O に再懸濁し、0.1 体積の 3 M 酢酸 Na 及び 2.0 体積のエタノールを加えることにより再沈殿させた。 A_{260} における吸収及びゲル電気泳動による判断でペレット中に抽出可能な RNA は回収されなかった。

粉砕抽出物からの *Cry j I* の精製における有用な手段となる。同様に、組み替え *Cry j I* に結合するモノクローナル抗体も免疫アフィニティークロマトグラフィーに用いることができる。さらに生成されたモノクローナル抗体は診断目的にも有用である。これらの *Cry j I* の異なるイソ型に対していくらかの特異性を示し、従ってこれらのイソ型の特性化の有用な手段となる異なる mAbs を誘起することも可能である。

実施例 2

日本杉花粉からの RNA の抽出の試み

商業的に入手可能な、非脱脂クリプロメリア ジャボニカ (日本杉) 花粉から RNA を得る多くの試みが成された (Hollister Stier, Seattle, WA)。最初、試料を 4 M のグアニジン緩衝液中に懸濁して溶解し、液体窒素中で粉砕し、遠心により 5.7 M の塩化セシウムを介してペレット化する Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) の方法が用いられた。量の異なるグアニジンライシス緩衝液 (10 及び 25 ml) 中で種々の量 (3、5 及び 10 g) の花粉を試した。セシウムを介した遠心により管の底に粘性の材料が生じ、そこから RNA ペレットを回収することはできなかった。この案を用いて設想したアンブrosia アルテミシイフォリア (Ambrosia artemisiifolia) (ふたぐさ) 花粉から RNA を得ることはできたが (Greer Laboratories,

最後に、500 mg のクリプトメリア ジャボニカ花粉をドライアイス上の乳鉢及び乳棒により粉砕し、Frankis and Mascarenhas (1980) Ann. Bot. 45: 595-599 の以前の記載の通り 0.1% の DEPC で終夜処理した 0.2 M NaCl、1 mM EDTA、1% の SDS を含む 5 ml の 50 mM トリス pH 9.0 中に懸濁した。フェノール/クロロホルム/イソミルアルコール (25:24:1 で混合) で 5 回抽出した後、0.1 体積の 3 M 酢酸 Na 及び 2 体積のエタノールを用いて材料を水相から沈殿させた。遠心によりペレットを回収し、 dH_2O に再懸濁し、65℃ に加熱した沈殿材料を可溶化した。塩化リチウムを用いてさらに沈殿させることはしなかった。 A_{260} における吸収及びゲル電気泳動により決定して、検出できる RNA は回収されなかった。

要するに、市販の花粉から RNA を回収することはできなかった。RNA が保存又は輸送の間に分解したかどうか、又はこの実施例で用いた案が現存する RNA を回収できなかったのかどうかはわからない。しかし RNA は新しいクリプトメリア ジャボニカ花粉及び雄球果試料から回収した (実施例 3 を参照)。

実施例 3

日本杉花粉及び雄球果からの RNA の抽出及び *Cry j I* のクローニング

Arnold Arboretum (Boston, MA) にて 1 本のクリプトメリア ジャボニカ (日本杉) の木から集めた新しい花粉及び雄球果試料は、直接にドライアイス上で凍結した。基本的に Frankis and Mascarenhas, 同上により記載の要領で

500mgの各試料からRNAを調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒を用いて粉砕し、0.1% DEPCで終夜処理した0.2M NaCl、1mM EDTA、1% SDSを含む5mlの50mMトリリス pH9.0中に懸濁した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1で混合)で5回抽出した後、0.1体積の2M酢酸Na及び2体積のエタノールを用いてRNAを水相から沈澱させた。遠心によりベレットを回収し、dH₂O中に再懸濁し、65℃に5分間加熱した。2mlの4M塩化リチウムをRNA試料に加え、それらを0℃で終夜インキュベートした。遠心によりRNAベレットを回収し、1mlのdH₂O中に再懸濁し、再度3Mの酢酸ナトリウム及びエタノールを用いて終夜沈澱させた。最終的ベレットを100μlのdH₂O中に再懸濁し、-80℃にて保存した。

商業的に入手可能なキット(cDNA合成系キット、BRL、Gaithersburg, MD)を用い、Gubler and Hoffman(1983) Gene 25:263-269の方法に従ってオリゴdTプライミングにより、8μgの頭状花及び4μgの花粉RNAから第1鎖cDNAを合成した。縮重オリゴヌクレオチドCP-1(これは配列5'-GATAATCCGATAGATAG-3'を有し、ここで位置3のTはCであることもでき、位置6のTはCであることもでき、位置9のGはA、T又はCであることもでき、位置12のAはT又はCであることもでき、位置15のTはCであることもでき、位置16のAはTであることもでき、位置17のGはCであることもできる、配列番号:3)、及びプライマーEDTならびにEDを用いてCry j 1をコードするcDNAを増幅する試みが成された。プライマーEDTは

11のTはCであることもでき、位置17のGはA、T又はCであることもでき、位置20のGはAであることもでき、位置23のTはCであることもでき、位置24のGはCであることもできる)(配列番号:4)、組み込まれたプライマー(nested primer)及び上記のEDを用いて第2の増幅を行った。プライマーCP-2中の配列5'-GGGAATTC-3'(配列番号:4の塩基1-8)は、クローニングの目的で加えられたEco RI部位を示し、残りの縮重オリゴヌクレオチド配列はCry j 1のアミノ酸13-18(AsnTrpAlaGlnAsnArg、配列番号:1のアミノ酸13-18)をコードする。多重(multiple)DNAバンドを1% GTGアガロースゲル(FMC, Rodkport, ME)上で分析し、そのいずれもSambrook et al. 同上の方法に従って行ったサザンプロットにおいて³²P末端-標識プローブCP-3(配列番号:5)とハイブリッド形成しなかった。従って特定のCry j 1 DNAバンドを選択することができず、この方法は続行しなかった。CP-3は配列5'-CTGCAGCCATTTTCACATTAAA-3'を有し、位置9のAはGであることもでき、位置12のTはCであることもでき、位置18のAはGであることもでき、位置21のAはGであることもできる(配列番号:5)。イノシン(I)は、縮重度を減少させるために位置15でG又はA又はT又はCの代わりに用いられる(Knoth et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10932)。プライマーCP-3中の配列5'-CTGCAG-3'(配列番号:5の塩基1-6)はクローニングの目的で加えられたPst I部位を示し、残りの縮重オリゴヌクレオチド配列は、

配列5'-GGAATTCTCTAGACTGCAGGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'(配列番号:24)を有する。プライマーEDは配列5'-GGAATTCTCTAGACTGCAGGT-3'(配列番号:23)を有する。CP-1はCry j 1のアミノ末端の最初の6アミノ酸(AspAsnProIleAspSer、配列番号:1のアミノ酸1-6)をコードする縮重オリゴヌクレオチド配列である。EDTは遺伝子のポリA尾部とハイブリッド形成する。オリゴヌクレオチドはすべてResearch Genetics, Inc. Huntsville, ALにより合成された。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は商業的に入手可能なキット(GeneAmp DNA増幅キット、Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)を用い、それによりdNTPsを含む10μlの10×緩衝液を1μgのCP-1及び1μgのED/EDTプライマー(ED:EDTは3:1モル比)、cDNA(20μlの第1鎖cDNA反応混合物から3-5μl)、0.5μlのAmplitaqDNAポリメラーゼと混合し、蒸留水で100μlとすることにより行った。

試料は、プログラム可能熱制御器(MJ Research, Inc., Cambridge, MA)を用いて増幅した。増幅の最初の5ラウンドは94℃における1分間の変性、45℃における1.5分間のプライマーの鋳型へのアニーリング、及び70℃にて2分間の鎖延長を含む。増幅の最後の20ラウンドは、上記の変性、55℃にて1.5分間のアニーリング及び上記の延長を含む。その後この最初の増幅の5%(5μl)を用い、それぞれ1μgのCP-2(これは配列5'-GGGAA TTCAATTGGGCGCAGAATGG-3'を有し、ここで位置

Cry j 1の内部配列からのアミノ酸PheAsnValGluAsnGly(配列番号:1のアミノ酸327-332)をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。

第1PCRをやはり上記のCP-1(配列番号:3)及びCP-3(配列番号:5)を用いて第1鎖cDNAに関して行った。第2PCRはCP-2(配列番号:4)及びCP-3(配列番号:5)を用い、第1反応物の5%を用いて行った。再び多重バンドが観察され、そのいずれもサザンプロットにおいてCry j 1と特異的に同定することができず、この方法も続行しなかった。

その後約4μg(花粉)又は8μg(頭状花)のRNAから、商業的に入手可能なキット(cDNA合成系キット、BRL、Gaithersburg, MD)を用いて二重鎖cDNAを合成した。フェノール抽出及びエタノール沈澱の後、T4 DNAポリメラーゼ(Promega, Madison, WI)を用いてcDNAを平滑化し、Rafnar et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:1229-1236; Frohman et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002; 及びRoux et al. (1990) Biotech. 8:48-57の方法に従い修正固定PCR反応(modified Anchored PCR reaction)で用いるために、エタノール沈澱させ、自己アニーリングしたAT(配列番号:20)及びAL(配列番号:22)オリゴヌクレオチドに連結した。オリゴヌクレオチドATは配列5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCGATCGATCATTT-3'(配列番号:20)(Rafnar et al.

同上)を有する。オリゴヌクレオチドAは配列5'-AATGATC
GATGCT-3' (配列番号: 22) (Rafnar et al.
同上)を有する。Cry j Iのアミノ末端を、連結されたcDNA
(20 μlの反応物から3 μl)から、それぞれ1 μgのオリゴヌクレ
オチドAP (配列番号: 21) 及び縮重Cry j IプライマーCP-
7 (これは配列5'-TTCATTCGATTCTGGGCCCC-3'を
有し、ここで位置8のGはTであることもでき、位置9のAはGである
こともでき、位置12のCはTであることもでき、位置15のGはA、
T又はCであることもできる) (配列番号: 6)を用いて増幅した。イ
ノシン (I) は縮重を減少させるために位置6にてG又はA又はT又は
Cの代わりに用いられる (Knoth et al. 同上)。縮重オリ
ゴヌクレオチドCP-7 (配列番号: 6) は、Cry j Iのアミノ
末端からのアミノ酸14-20 (TrpAlaGlnAsnArgMe
tLys (配列番号: 1のアミノ酸14-20)をコードするコード鎖
配列に対応する非コード鎖配列である。オリゴヌクレオチドAPは配
列5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCG-3' (配列番号:
21)を有する。

第1 PCR反応は、本明細書に記載の通りに行った。この最初の増幅
の5% (5 μl)をその後、本明細書に記載の通りそれぞれ1 μgのA
P (配列番号: 21) 及び縮重Cry j IプライマーCP-8 (配
列番号: 7) ならびに内部組み込みCry j Iオリゴヌクレオチド
プライマーを用いた第2の増幅に用いた。プライマーCP-8は配列
5'-CCTGCAGCGATTCTGGGCCCCAAATT-3'を有
し、位置9のGはTであることもでき、位置10のAはCであることも

でき、位置13のCはTであることもでき、位置16のGはA、T又は
Cであることもでき、位置23のAはGであることもできる (配列番号
: 7)。ヌクレオチド5'-CCTGCAG-3' (配列番号: 7の塩基
1-7)は、クローニングの目的で加えられたPst I制限部位を示
す。残りの縮重オリゴヌクレオチド配列は、Cry j Iのアミノ末
端からのCry j Iのアミノ酸13-18 (AsnTrpAlaG
lnAsnArg、配列番号: 1のアミノ酸13-18)をコードする
コード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。増幅の主生成物は、エ
チジウムブロミド (EtBr) -染色3% GTGアガロースゲル上で視
覚化した通り、約193塩基対のDNAバンドであった。

順にクロロホルム、フェノール及びクロロホルムを用いた抽出及びそ
の後0.5体積の7.5 M酢酸アンモニウム及び1.5体積のイソプロパノ
ールを用いて-20℃で沈殿させることにより増幅DNAを回収した。
沈殿及び70%エタノールを用いた洗浄の後、15 μl反応にてDNA
をXba I及びPst Iで同時に消化し、分取3% GTG NuS
ieve低融点ゲル (FMC, Rockport, ME)を通して電気
泳動させた。適した大きさのDNAバンドをEtBr染色により視覚化
し、切り出し、商業的に入手可能な配列決定キット (Sequenase
キット, U. S. Biochemicals, Cleveland,
OH)を用い、ジデオキシ連鎖停止法 (Sanger et al.
(1977) Proc. Natl Acad Sci. USA 74:
5463-5476)により配列決定するために、適当に消化されたM
13mp18中に連結した。最初は連結可能な材料が噬菌体-誘導RNA
Aのみから誘導できたと思われる。しかしその後の実験で、連結可能な

材料が花粉-誘導RNAから、及び雄球果-誘導RNAから生成された
PCR生成物から回収できたことが示された。

JC71.6と称されたクローンはCry j Iの部分的配列を含
むことが見いだされた。これは開示されているCry j IのNH₂-
末端配列 (Taniai et al. 同上)と完全に同一であるこ
とにより、Cry j Iの真性 (authentic) クローンとし
て確認された。位置7のアミノ酸はシステイン (Cys) であることが
決定され、米国特許第4,939,239号明細書に開示されている配列
と一致した。アミノ酸の番号付けは成熟蛋白質の配列に基づき、アミノ
酸1はCry j IのNH₂-末端として開示されている (Tani
ai et al. 同上) アスパラギン酸 (Asp) に対応する。開始
メチオニンは成熟蛋白質の第1アミノ酸に関してアミノ酸21であるこ
とが見いだされた。開始メチオニンの位置は、上流の枠内停止コドン
(in-frame-stop codon)の存在、及び回りのヌク
レオチド配列がLutcke et al. (1987) EMBO J.
6: 43-48により報告された開始メチオニンを含む植物の共通配列
と78%相同であることから支持された。

Cry j I遺伝子の残りをコードするcDNAは、第1 PCR反
応でオリゴヌクレオチドCP-9 (これは配列5'-ATGGATTTC
CCCTTGCTTA-3'を有する) (配列番号: 8) 及びAP (配
列番号: 21)を用いることにより結合されたcDNAからクローニン
グした。オリゴヌクレオチドCP-9 (配列番号: 8) は、Cry j I
のリーダー配列からのCry j Iのアミノ酸MetAspSe
rProCysLeu (配列番号: 1のアミノ酸21-16)をコード

し、部分的Cry j IクローンJC76.1に関して決定されたヌ
クレオチド配列に基づく。

第2 PCR反応は、それぞれ1 μgのAP (配列番号: 21) 及びC
P-10 (これは配列5'-GGGAATTCGATAATCCCAT
AGACAGC-3'を有する) (配列番号: 9) 及び組み込まれたプ
ライマーを用い、最初の増幅混合物の5%につき行った。プライマーC
P-10のヌクレオチド配列5'-GGGAATTC-3' (配列番号:
9の塩基1-8)は、クローニングの目的で加えられたEco RI制
限部位を示す。残りのオリゴヌクレオチド配列はCry j Iのアミ
ノ酸1-6 (AspAsnProIleAspSer) (配列番号: 1
のアミノ酸1-6)をコードし、部分的Cry j IクローンJC
76.1に関して決定されたヌクレオチド配列に基づく。増幅されたD
NA生成物を上記の要領で精製し、沈殿させ、その後Eco RI及び
Xba Iで消化し、分取1%低融点ゲルを通して電気泳動させた。D
NA主バンドを切り出し、配列決定のためにM13mp19及びpUC
19に連結した。この場合も連結可能な材料は花粉-誘導RNA及び雄
球果-誘導RNAから生成されたcDNAから回収された。消化された
pUC19JC91a及びpUC19JC91dの2つのクローンを全
長配列決定のために選択した。その後これらが同一の配列を有するこ
とが見いだされた。

商業的に入手可能なキット (Sequenaseキット (U. S.
Biochemicals, Cleveland, OH))を用い、ジデ
オキシ連鎖停止法 (Sanger et al. 同上)によりDNAを
配列決定した。M13前進 (forward) 及び逆プライマー (re

verse primer) (N. E. Biolabs, Beverly, MA) ならびに内部配列決定プライマーCP-13 (配列番号: 10)、CP-14 (配列番号: 11)、CP-15 (配列番号: 12)、CP-16 (配列番号: 13)、CP-18 (配列番号: 15)、CP-19 (配列番号: 16) 及びCP-20 (配列番号: 17) を用いて両鎖を完全に配列決定した。CP-13は配列5'-ATGCTATGTACATTGC-3' (配列番号: 10) を有する。CP-13 (配列番号: 10) はCry 1 Iのアミノ酸82-87 (MetProMetTyrIleAla、配列番号: 1のアミノ酸82-87) をコードする。CP-14は配列5'-GCAATGTACATAGGCAT-3' (配列番号: 11) を有し、CP-13 (配列番号: 10) の非コード鎖配列に対応する。CP-15は配列5'-TCCAATTCTTCTGATGGT-3' (配列番号: 12) を有し、これはCry 1 Iのアミノ酸169-174 (SerAsnSerSerAspGly、配列番号: 1のアミノ酸169-174) をコードする。CP-16は配列5'-TTTTGTCAATTGAGGAGT-3' (配列番号: 13) を有し、Cry 1 Iのアミノ酸335-340 (ThrProGlnLeuThrLys、配列番号: 1のアミノ酸335-340) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。CP-18は配列5'-TAGCAACTCCAGTCGAAGT-3' (配列番号: 15) を有し、これはCP-18 (配列番号: 15) の第4ヌクレオチドが正しいヌクレオチドTではなくCとして合成されている以外は、Cry 1 Iのアミノ酸181-186 (ThrSerThrGlyValThr、配列番号: 1のアミ

ノ酸181-186をコードするコード鎖配列に実質的に対応する非コード鎖配列である。配列5'-TAGCTCTCATTTGGTGC-3' (配列番号: 16) を有するCP-19は、Cry 1 Iのアミノ酸270-275 (AlaProAsnGluSerTyr、配列番号: 1のアミノ酸270-275) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。CP-20は配列5'-TATCGAATTGGTGGGAGT-3' (配列番号: 17) を有し、これはCry 1 Iのアミノ酸251-256 (TyrAlaIleGlyGlySer、配列番号: 1のアミノ酸251-256) のコード鎖配列である。配列決定したDNAは図4a及び4bに示す配列 (配列番号: 1) を有することが見いだされた。これは2つのオーバーラップクローンJC71.6及びpUC19J91Aからの混成 (composite) 配列である。Cry 1 Iの完全cDNA配列は、5'非翻訳配列の66ヌクレオチド、開始メチオニンのコドンで始まる1122ヌクレオチドの読み取り枠、及び3'非翻訳領域を含む1312ヌクレオチドを含む。3'非翻訳領域25ヌクレオチド5'ポリA尾中に共通ポリAデニル化シグナル配列がある。開始メチオニンの位置は、枠内上流停止コドンの存在により、及び開始メチオニンを含む植物共通配列との78%の相同性 (Lutcke et al. (1987) EMBO J. 6: 43-48) の植物の場合のAACAAUGGC共通配列と比較してCry 1 I中に見いだされたAAAAAUGGA (配列番号: 1の塩基62-70)) により確証された。読み取り枠は3747アミノ酸の蛋白質をコードし、その最初の21アミノ酸は成熟蛋白質から切断されたリーダー配列を含む。成熟蛋白質のアミノ末端は公開されている

NH₂-末端配列 (Tanai et al. (1988) 同上)、及び精製された本来のCry 1 Iの直接アミノ酸分析により決定された配列との比較により同定された。353アミノ酸を含む成熟蛋白質の推定アミノ酸配列は、NH₂-末端に関する最初の20アミノ酸及び16個の連続内部アミノ酸を含んで公開されているCry 1 Iの蛋白質配列 (Tanai et al. 同上) と完全な配列同一性を有する。成熟蛋白質は、共通配列N-X-S/Tに対応するN-結合グリコシル化部位の可能性のある5個の部位も含む。

実施例4

日本で収集された日本杉花粉からのRNAの抽出

日本でブールされたクリプトメリア ジャポニカ (日本杉) の木から収集した新しい花粉を直後にドライアイス上で凍結した。基本的にFrankis and Mascarenhas Ann. Bot. 45: 595-599に記載の要領で500mgの花粉からRNAを調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒を用いて粉砕し、0.1% DEPCで終夜処理した。0.2M NaCl、1mM EDTA、1% SDSを含む5mlの50mMトリスpH9.0中に懸濁した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1で混合) で5回抽出した後、0.1体積の3M酢酸Na及び2体積のエタノールを用いてRNAを水相から沈殿させた。遠心によりベレットを回収し、dH₂O中に再懸濁し、65℃に5分間加熱した。2mlの4M塩化リチウムをRNA試料に加え、それらを9℃で終夜インキュベートした。遠心によりRNAベレットを回収し、1mlのdH₂O中に再懸濁し、再度3Mの酢酸ナトリウム及びエタノールを用いて終夜沈降させた。最

終的ベレットを100μlのdH₂O中に再懸濁し、-80℃にて保存した。

Gubler and Hoffman (1983) Gene 25: 263-269の方法に従い、オリゴdTプライミングを用いてcDNA合成系キット (BRL) により8μgの花粉RNAから二重鎖cDNAを合成した。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) はGeneAmp DNA増幅キット (Perkin Elmer Cetus) を用い、それによりdNTPsを含む10μlの10x緩衝液をそれぞれ100pmolのセンスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、(400μlの二重鎖cDNA反応混合物中の10μl)、0.5μlのAmplitaq DNAポリメラーゼと混合し、蒸留水で100μlとして行った。

試料は、MJ Research, Inc. (Cambridge, MA) からのプログラム可能熱制御器を用いて増幅した。増幅の最初の5ラウンドは94℃における1分間の変性、45℃における1分間のプライマーの鋳型へのアニーリング、及び72℃にて1分間の鎖延長を含む。増幅の最後の20ラウンドは、上記の変性、55℃にて1分間のアニーリング及び上記の鎖延長を含む。

二重鎖cDNAの増幅に以下の7種類のCry 1 Iプライマー対を用いた: CP-9 (配列番号: 8) 及びCP-17 (配列番号: 14)、CP-10 (配列番号: 9) 及びCP-17 (配列番号: 14)、CP-10 (配列番号: 9) 及びCP-16 (配列番号: 13)、CP-10 (配列番号: 9) 及びCP-19 (配列番号: 16)、CP-10 (配列番号: 9) 及びCP-18 (配列番号: 15)。

15)、CP-13 (配列番号: 10) 及びCP-17 (配列番号: 14)、ならびにCP-13 (配列番号: 10) 及びCP-19 (配列番号: 16)。CP-17 (配列番号: 14) は配列5'-CCTGCAGAAGCTTCATCAACAACGTTTAGA-3'を有し、アミノ酸SKRC* (配列番号: 1のアミノ酸350-353及び停止コドン) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列に対応する。ヌクレオチド配列5'-CCTGCAGAAGCTT-3' (配列番号: 14の塩基1-13) はクローニングの目的で加えられたPst I及びHind III制限部位を示す。ヌクレオチド配列5'-TCA-3' (配列番号: 14の塩基13-15) は停止コドンの非コード鎖配列に対応する。エチジウムブロミド (EtBr) 染色アガロースゲル上で見ると、増幅はすべて予想の大きさの生成物を与えた。これらのプライマー対の2つを増幅に用い、その生成物を全長配列決定のためにpUC19中にクローニングした。CP-10 (配列番号: 9) 及びCP-16 (配列番号: 13) を用いて二重鎖cDNAにつを行ったPCR反応は、約1.1kbのバンドを与え、それをJC130と称した。8µgの花粉RNAを用いて上記の要領で別の第1鎖cDNA反応を行い、オリゴヌクレオチドプライマーCP-10 (配列番号: 9) 及びCP-17 (配列番号: 14) を用いて増幅した。この増幅は成熟蛋白質のアミノ末端から停止コドンまでの全長cDNAを与え、それをJC135と称した。

増幅されたDNAを順にクロロホルム、フェノール及びクロロホルムで抽出し、その後0.5体積の7.5%酢酸アンモニウム及び1.5体積のイソプロパノールを用いて-20℃にて沈澱させることにより回収し

なくTを有した。このヌクレオチドの変更は、成熟Cry I 蛋白質のアミノ酸60におけるTyrからHisへの推定アミノ酸変更を生ずる。この多型性はまだ、独立して誘導されたPCRクローンにより、又は直接アミノ酸配列決定により確認されていない。しかし一次ヌクレオチド (primary nucleotide) 及びアミノ酸配列におけるそのような多型性は予想される。

実施例5

Cry I の発現

Cry I の発現は以下の通りに行われた。10µgのpUC19JC91aをXba Iで消化し、沈澱させ、T4ポリメラーゼを用いて平滑化した。Bam HIリンカー (N. E. Biolabs, Beverly, MA) をpUC19JC91aに終夜平滑末端連結し、NACSイオン交換ミニカラム (BRL, Gaithersburg, MD) を通す経過により過剰のリンカーを除去した。その後結合されたcDNAをEco RI及びBam HIで同時に消化した。この消化物を1%SeaPlaque低融点アガロースゲルを通して電気泳動することにより、Cry I 挿入片 (成熟蛋白質のアミノ末端をコードするヌクレオチドから停止コドンを経て延びる) を単離した。その後ATG開始コドンの3'の直後に6ヒスチジン (His6) をコードする配列を含み、その後ユニークEco RI/エンドヌクレアーゼ制限部位が続くように修正され、適当に消化された発現ベクターpET-11d (Novagen, Madison, WI: Jameel et al. (1990) J. Virol. 64: 3963-3966) 中に挿入片を連結した。ベクター中の第2のEco RI/エンドヌクレア

ゼ制限部位は、隣接するCla I及びHind III/エンドヌクレアーゼ制限部位と共にEco RI及びHind IIIを用いた消化によりあらかじめ除去し、平滑化し、連結した。ヒスチジン (His₆) 配列は、Ni²⁺キレートカラム (Hochuli et al. (1987) J. Chromatog. 411: 177-184; Hochuli et al. (1988) Bio/Tech. 6: 1321-1325) 上の組み替え蛋白質 (Cry I) のアフィニティー精製のために加えた。組み替えクローニングを用い、T7ポリメラーゼをコードする遺伝子の前にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) -誘導性プロモーターを有するプラスミドが内在する大腸菌 (*Escherichia coli*) 株BL21-DE3を形質転換した。IPTGを用いた誘導により多量のT7ポリメラーゼが発現され、それはT7プロモーターを有するpET-11dにおける組み替え蛋白質の発現に必要である。クローンpET-11dΔHRhis₆JC91a.dは、CP-14 (配列番号: 11) を用いたジデオキシ配列決定 (Sanger et al. 同上) により、発現のための正しい読み取り枠におけるCry I クローンであることが確認された。

両鎖はM13前導及び逆プライマー (N. E. Biolabs, Beverly, MA) ならびに内部配列決定プライマーCP-13 (配列番号: 10)、CP-15 (配列番号: 12)、CP-16 (配列番号: 13)、CP-18 (配列番号: 15)、CP-19 (配列番号: 16) 及びCP-20 (配列番号: 17) を用いて配列決定した。配列決定により、増幅JC130からの2個のクローン (JC130a及びJC130b) ならびに増幅JC135からの1個のクローン (JC135g) がCry I クローンであることが見いだされた。クローンJC130a及びJC130gのヌクレオチド及び推定アミノ酸配列は以前から既知のCry I 配列 (配列番号: 1) と同一であった。クローン130bは以前から既知のCry I 配列 (配列番号: 1) と1個のヌクレオチドの差を含むことが見いだされた。クローンJC130bは配列番号: 1のヌクレオチド位置306に以前に記載のCでは

ーゼ制限部位は、隣接するCla I及びHind III/エンドヌクレアーゼ制限部位と共にEco RI及びHind IIIを用いた消化によりあらかじめ除去し、平滑化し、連結した。ヒスチジン (His₆) 配列は、Ni²⁺キレートカラム (Hochuli et al. (1987) J. Chromatog. 411: 177-184; Hochuli et al. (1988) Bio/Tech. 6: 1321-1325) 上の組み替え蛋白質 (Cry I) のアフィニティー精製のために加えた。組み替えクローニングを用い、T7ポリメラーゼをコードする遺伝子の前にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) -誘導性プロモーターを有するプラスミドが内在する大腸菌 (*Escherichia coli*) 株BL21-DE3を形質転換した。IPTGを用いた誘導により多量のT7ポリメラーゼが発現され、それはT7プロモーターを有するpET-11dにおける組み替え蛋白質の発現に必要である。クローンpET-11dΔHRhis₆JC91a.dは、CP-14 (配列番号: 11) を用いたジデオキシ配列決定 (Sanger et al. 同上) により、発現のための正しい読み取り枠におけるCry I クローンであることが確認された。

組み替え蛋白質の発現は最初の小培養 (50ml) において確認された。クローンpET-11dΔHRhis₆JC91a.dの終夜培養物を用い、アンピシリン (200µg/ml) を含む50mlの培地 (Brain Heart Infusion Media, Difco) に接種し、A₅₅₀=1.0まで成育し、その後IPTG (1mM、最終濃度) で2時間誘導した。1mlのバクテリアのアリコートを誘導の

前後に集め、遠心によりペレット化し、50mMトリスHCl、pH 6.8、2mM EDTA、1% SDS、1% β -メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.25%ブロモフェノールブルー (Studier et al., (1990) Methods in Enzymology 185: 60-89) 中で5分間ペレットを煮沸することにより粗細胞ライセートを調製した。組換え蛋白質の発現は、Sambrook et al. 同上に従い、40 μ lの粗ライセートを含有したクーマシーブルー染色 SDS-PAGEゲル上の約38 kDaの予想された分子量を有するバンドとして視覚化された。負の標準は、Cry j Iを有するプラスミドを含む非病原性細菌からの粗ライセート及びプラスミドを含まない細菌からの誘導ライセートを含んだ。

その後pET-11dΔHRhis₊JC91a. dクローンを、組換え蛋白質発現及び精製のために大規模に成育した。組換え蛋白質を含む2mlの培養液を8時間成育し、固体培地（例えば200 μ g/mlのアンプシリンを含むLB培地 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) 中の1.5%アガロースを含む6個のペトリ皿 (100×15mm) 上に線状に接種し、終夜成育して密着させ、その後アンプシリン (200 μ /ml) を含む9Lの液体培地 (Brain Heart Infusion media, Difco) 中にこすり落とした。培養をA₆₀₀が1.0となるまで成育し、IPTGを加え (最終濃度1mM)、さらに2時間培養を成育した。

遠心 (7,930 × g, 10分) により細菌を回収し、90mlの6MグアニジンHCl、0.1M Na₂HPO₄、pH 8.0中で

1時間激しく振って溶解した。遠心 (11,000 × g, 10分, 4℃) により不溶性物質を除去した。ライセートのpHをpH 8.0に調節し、6MのグアニジンHCl、100mMのNa₂HPO₄、pH 8.0で平衡化した80mlのニッケルNTAAアガロースカラム (Qiagen) にライセートを適用した。カラムを6MのグアニジンHCl、100mMのNa₂HPO₄、10mMのトリス-HCl、pH 8.0、その後8Mのウレア、100mMのNa₂HPO₄、pH 8.0、及び最後に8Mのウレア、100mMの酢酸ナトリウム、10mMのトリス-HCl、pH 6.3で順に洗浄した。カラムは、通過液がA₂₈₀ ≤ 0.05となるまで各緩衝液で洗浄した。

組換え蛋白質Cry j Iは、8Mのウレア、100mMの酢酸ナトリウム、10mMのトリス-HCl、pH 4.5を用いて溶解し、10mlのアリコートとして集めた。各成分の蛋白質濃度は、A₂₈₀及びブールされたピーク成分により決定した。集めた組換え蛋白質のアリコートをSambrook et al. 同上の方法に従い、SDS-PAGE上で分析した。

最初の9Lの試料JCpET-1は、クーマシーブルー染色 SDS-PAGEゲルのデンストメトリー (Shimadzu Flying Spot Scanner, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Braintree, MA) により決定して30mgのCry j Iを約78%の純度で与えた。同様にして調製した第2の9Lの試料、JCpET-2は41mgのCry j Iを約77%の純度で与えた。

実施例6

Cry j I-杉花粉主要抗原を用いた日本杉花粉アレルギー患者のT細胞研究

杉花粉抗原ペプチドへのT細胞応答

末梢血単核細胞 (PBMC) を、季節的な鼻炎の臨床的徴候を示し、日本杉花粉に関するMAST及び皮膚テストで陽性の日本杉花粉アレルギー患者からの60mlの末梢血のリンパ球分離培地 (LSM) 遠心により精製した。完全培地 (RPMI-1640、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン、5×10⁻⁴M β -メルカプトエタノール、及び5%の熱不活化ヒトAB血清を補足した10mM HEPES) の大量培養中の2×10⁶ PBL/mlを20 μ g/mlの部分的に精製された本来のCry j I (図2の3つのバンドに類似の3つのバンドを含む純度75%) を用い、加温5% CO₂インキュベーター中37℃にて7日間賦活することにより長期T細胞系を樹立し、Cry j I反応性T細胞を選別した。この初回免疫抗原の量は、ほとんどの杉花粉アレルギー患者からのT細胞の活性化に最適であるように決定した。生存細胞をLSM遠心により精製し、5単位の組換えヒトIL-2/ml及び5単位の組換えヒトIL-4/mlを補足した完全培地中で、細胞がもはやリンホカインに依存せず、“休止”と思われるまで最高3週間培養した。その後組換えCry j I (rCry j I)、精製した本来のCry j I又は組換えAmb a I.1 (rAmb a I.1) に対するT細胞増殖の能力を評価した。分析のために、96ウェルの丸底プレートにおいて二重又は三重のウェル中の200 μ lの完全培地中で2×10⁴の休止細胞を、4×10⁴のオートロガス エプスタイン-バーウイルス (E

BV)-形質転換B細胞 (下記の通りに調製) (25,000 RADsでガンマ線照射) の存在下で2-50 μ g/mlのrCry j I、精製した本来のCry j I又はrAmb a I.1を用い、2-4日間再賦活した。最適インキュベーションは3日であることが見いだされた。その後各ウェルに1 μ Ciのトリチウム化チミジン (16-20時間与えた。挿入されたカウントを液体シンチレーション計数のためにガラス繊維フィルターマット上に集め、加工した。図12は組換えCry j I、精製した本来のCry j I及び組換えAmb a I.1を用いた分析における抗原投与量の変化の効果を示す。図12の結果は、患者番号999が組換えCry j I及び精製された本来のCry j Iに良く応答するが組換えAmb a I.1に反応しないことを示している。これはCry j I T細胞エピソードがこの特定のアレルギー患者からのT細胞により認識され、rCry j IがそのようなT細胞エピソードを含むことを示唆している。抗原提示細胞として用いるための

(EBV)-形質転換B細胞の調製

オートロガスEBV-形質転換細胞系を25,000 Radで γ -線照射し、二次増殖分析及び二次大量賦活における抗原提示細胞として用いた。これらの細胞系は免疫蛍光フローサイトメトリー分析における標準としても用いられる。これらのEBV-形質転換細胞系は、12×75mmのポリプロピレン丸底Falconスナップキャップチューブ (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 中で37℃にて6時間、1 μ g/mlのホルホル12-ミリスレート13-アセテート (PMA) の存在下で1ml

のB-59/8 Marmoset細胞系(ATCC CRL1612, American Type Culture Collection, Rockville, MD)で状態調節した増地を用いて 5×10^6 のPBLをインキュベートすることにより形成した。その後これらの細胞を、10%の熱不活化ウシ胎児血清を補足する以外は上記で記載の通りのRPMI-1640中で 1.25×10^6 細胞/mlに希釈し、目に見えるコロニーが検出されるまで平底培養プレート中の200 μ lのアリコートとして培養した。その後、細胞系が樹立されるまでそれらをより大きなウェルに移した。

実施例7

主要杉花粉アレルゲンとしてのCry j I

日本杉花粉の主要アレルゲンとして報告されているCry j Iの重要性を調べるために、直接及び競争的ELISA分析の両方を行った。直接ELISA分析の場合、日本杉花粉に関する可溶性花粉抽出物(SPE)又は精製した本来のCry j I(蛋白質配列決定により純度90%にて分析)のいずれかをウェルに塗布し、これらの抗原へのヒトIgE抗体の結合を分析した。日本杉花粉MASTの得点が2.5かそれより大の15人の患者からの等体積の血漿を含む、プールされたヒト血漿及び2つの各患者の血漿試料をこの分析で比較した。図5はこれらの2つの抗原との結合の反応性の結果を示す。結合の全体的パターンは、塗布抗原がSPE(図5a)であっても又は精製された本来のCry j I(図5b)であっても非常に類似している。

競争的分析の場合、ELISAウェルに日本杉花粉SPEを塗布し、その後競争する精製された本来のCry j Iが溶液中に存在する下

でアレルギー患者のIgE結合を測定した。これらの分析におけるアレルギー性IgEの供給源は15人の患者からプールされた血漿(PHPと記す)又は日本杉MASTの得点が2.5又はそれより大の患者からの7個のそれぞれの血漿試料であった。プールされたヒト血漿試料を用いた競争的分析は、精製された本来のCry j Iの競争的結合能力を日本杉花粉SPE及び無関係のアレルゲン供体源、どくむぎSPEと比較する。図6はプールされたヒト血漿を用いた競争的ELISAの結果のグラフを示す。日本杉花粉SPE中に存在する蛋白質の濃度は各競争点において精製された本来のCry j Iより約170倍高い。この分析から、精製された本来のCry j Iが日本杉花粉可溶性花粉抽出物中に存在する蛋白質の全範囲に対するIgE結合に関して非常に良く競争することが明らかである。これはほとんどの抗-Cry j I IgEの反応性が精製された本来のCry j Iに向かうことを意味する。負の標準は特異的競争反応性を示さず、競争する溶液中のSPEが完全に塗布ウェルへの結合を除去することができる。この分析を、アレルギー性集団内のIgE応答の範囲の尺度として各患者の場合に繰り返した。図7はこの結果を示し、この場合は精製された本来のCry j Iを用いてSPEへの結合の競争を行った。患者は日本杉花粉SPEに対して異なる投与量応答を示すが、日本杉花粉SPEへの7人の患者のそれぞれのIgE結合は、精製された本来のCry j Iと競争することができたことを結果が示している。これらのデータの意味は、各患者の場合にIgEの反応性はCry j Iに向かうものが主であるが、患者の間でこの反応性には変動があることである。全体としての結果は、Cry j Iが日本杉花粉の主要アレルゲンであるという以

前の発見(Yasueda et al., (1988) 同上)をこれらのデータが支持していることである。

杉花粉アレルギー患者からのIgEを花粉蛋白質への反応性は、これらの蛋白質が変性されていると劇的に低下する。この性質の分析の方法の1つは直接結合ELISAによる方法であり、その場合塗布抗原は日本杉花粉SPE又は還元剤DTTの存在下で煮沸することにより変性した変性日本杉花粉SPEである。これをその後アレルギー患者の血漿を用いてIgE結合反応性に関して調べる。図8aは7つのそれぞれの血漿試料を用いたSPEへの直接結合分析を示す。図8bにおいて、変性SPEを用いた結合の結果は、この処置の後の反応性が顕著に低下することを示している。ELISAウェルへのCry j I結合の程度を決定するために、Amb a I&II蛋白質の種類に対するウサギポリクローナル抗血清を用いてCry j Iを検出した。これらの蛋白質はCry j Iと高度の配列の同一性(46%)を有し、この抗血清を交差反応性抗体検出系として用いることができる。結局、これらのデータはSPEの変性の後、IgE反応性が顕著に失われることを示す。

実施例8

IgE反応性及びヒスタミン放出分析

バクテリア中で発現され、その後精製された(実施例5に記載の通り)組換えCry j I蛋白質(rCry j I)をIgE反応性に関して調べた。この試験に適用された最初の方法は直接ELISAであり、ウェルに組換えCry j Iを塗布し、各患者につきIgE結合を分析した。図9はこの直接ELISAのグラフ図である。このデータの組における唯一の陽性の信号は、ウサギポリクローナル抗-Amb

a I&II(Rabbit anti-Amb a I&II)及びCry j Iと交差反応するAmb a Iに対して誘起されたモノクローナル抗体であるCBF2の2つの標準抗血清からの信号である。この方法により調べたすべての患者が組換えCry j IとのIgE反応性を示さなかった。

組換えCry j IへのIgE反応性を調べるために適用された他の分析法は捕獲ELISAであった。この分析の基礎は定義された抗体、この場合はCBF2を用い、抗原に結合させ、他のエпитープ部位に抗体を結合させるということである。この捕獲ELISAの形式は、1)ウェルにMAb CBF2を塗布し、2)抗原又はPBS(1種の負の標準として)を加え、塗布されたMAbとの特異的相互作用により捕獲させ、3)標準抗体抗-Amb a I&II(図10b)又はヒトアレルギー性血漿(図10b)を検出抗体として加え、4)抗体結合の検出を評価することである。図10a及び10bはこれらの分析の結果のグラフである。IgE分析の場合、プールされたヒト血漿(15患者)を用いた。これらの結果からの結論は、この分析法によりヒトアレルギー性IgEのrCry j Iへの特異的な結合は示されなかったということである。しかし、図10bに示される標準抗体結合曲線により証明される通り、rCry j Iは捕獲される。rCry j IへのIgE結合の欠如は炭水化合物又は他の翻訳後修飾がないため、及び/又は大多数のIgEが変性Cry j Iと反応できないためであり得る。RAST、競争的ELISA及びウェスタンブロットデータもrCry j Iへの特異的なIgE反応性を示さない(データは示していない)。

日本杉花粉 SPE、精製された本来の Cry j 1 及び rCry j 1 を抗原として加え、1人の日本杉花粉アレルギー患者につきヒスタミン放出分析を行った。この分析は、ヒトの好塩基球の媒介物の放出を介した IgE 反応性の尺度である。図 11 に示すこの分析の結果は、広い濃度範囲にわたる精製された本来の Cry j 1 及び日本杉花粉 SPE の両方の場合の強いヒスタミン放出を示している。Cry j 1 の場合に測定可能なヒスタミン放出がある唯一の点は、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の最高濃度の点である。rCry j 1 によるこの放出に関して可能な 2 つの説明は、1) 非常に低い割合の抗-Cry j 1 IgE が特異的反応性が組み替え形態の Cry j 1 を認識することができることか、又は 2) 最高の抗原濃度においてのみ観察される、存在量の少ないバクテリア汚染物により起こる非特異的放出である。これまでのところ、この結果は 1 人の患者において示されたのみである。さらに、示されたデータは各蛋白質濃度における 1 個のデータ点からのものである。

大腸菌発現物質は T 細胞反応性を有するので (実施例 6)、組み替えにより発現されたこの Cry j 1 蛋白質を免疫治療に用いることができるが、クリプトメリア ジャポニカ アトープからの IgE と結合しないと思われ、又試験管内でそのようなアトープの肥満細胞及び好塩基球からヒスタミンを放出させない。IgE と結合することができる rCry j 1 の発現は、酵母、昆虫 (バクロウィルス) 又は哺乳類細胞 (例えば CHO、ヒト及びマウス) において行うことができた。活発に IgE と結合できる rCry j 1 は組み替え物質を診断目的で利用する場合に重要である。

本発明をその好ましい態様に言及しながら説明したが、他の態様は同一の結果を与えることができる。本発明の変更及び修正は当該技術における熟練者に明らかであり、そのような修正及び同等例のすべてが添付の請求の範囲に含まれ、本発明の真の精神及び範囲に従うものとする。

配列表

配列番号: 1

配列の長さ: 1337

配列の型: 核酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: クリプトメリア ジャポニカ (Cryptomeria japonica)

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 66..1187

配列の特徴

特徴を表す記号: mat_peptide

存在位置: 129..1187

配列

```

AGTCAATGTC CTCATAATCA TAGCATAGCC GTATAGAAAG AAATCTTACA CTCTGCTACC 60
AAAAA ATG GAT TCC CCG TCC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT 107
Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe
-23 -20 -15 -10
GTA ATT GGA TCT TCC TTT TCT CAT AAT CCC ATA GAC AGC TCC TCG ACA 155
Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg
-5 1 5
GGA GAC TCA AAC TCG CCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TCT GCA 203
Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala
10 15 20 25

```

```

CTC GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG GCA GGC AAG GCA GCA GAT CTT CAT 251
Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr
30 35
AGC CTC ACC AAC TCA GAT GAC GAC CCG CTG AAT CCT GCA CCA GGA ACT 299
Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr
45 50 55
CTC GGC TAT GGA GCA ACC CGA GAT AGG CCC CTG TCG ATA ATT TTC AGT 347
Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser
50 55 60 65 70
GGC AAT ATG AAT TATA AAG CTC AAA ATG CCG ATG TAC ATT CCG GCG TAT 395
Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr
75 80 85 90 95
AAG ACT TTT GAT GGC AGG GGA GCA CAA GTT TAT ATT CCG AAT GCG GGT 443
Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly
100 105 110 115
CCC TGT CTG TTT ATC AAG ACA GTT AGC AAT GTT ATC ATA CAC GGT TTC 491
Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu
120 125 130 135
TAT CTG TAC GCG TGT AGT ACT AGT GTT TTG GCG AAT GTT TTC ATA AAC 539
Thr Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn
140 145 150 155 160
GAG AGT TTT GCG CTG GAG CCG GTT CAT CCG CAG GAT GCG GAT CCG CTT 587
Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu
165 170 175 180 185
ACT CTG CCC ACT CCG ACA AAT ATT TCG ATT GAT CAT AAT TCT TTC TCC 635
Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser
190 195 200 205 210
AAT TCT TCT GAT CCG CTG GTC GAT GTC ACT CTT ACT TCG ACT GGA GTT 683
Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val
215 220 225 230 235
ACT ATT TCA AAC AAT CTT TTT TTC AAC CAT CAT AAA CTG ATG TTG TTA 731
Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu
240 245 250 255 260
GGC CAT GAT GAT GCA TAT ACT GAT GAC AAA TCC ATC AAG CTG ACA CTC 779
Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val
265 270 275 280 285
GGC TTC AAT CAA TTT GCA CCG AAC TCT GGA CAA AGA ATC CCC AGC GCA 827
Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala
290 295 300 305 310
GGA TAT GGA CTT GTA CAT GTT GCA AAC AAT AAT TAT GAC CCA TCG ACT 875
Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr
315 320 325 330 335
ATA TAT GCA ATT CCG GCG AGT TCA AAT CCA ACC ATT CTA ACT GAA GCG 923
Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly
340 345 350 355 360

```

AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG AGC TAC AAG AAG CAA GTA ACC ATA 971
 Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile 270 275 280
 GGT ATT GCA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGG GTC TGC CAA 1019
 Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln 285 290 295
 TCT ACA CAA GAT GTT TTT TAT AAT GGA GGT TAT TTT GTA TCA TCA GGG 1067
 Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly 300 305 310
 AAA TAT GAA GGG GGT AAT ATA TAC ACA AAG AAA GAA GGT TTC AAT GTT 1115
 Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val 315 320 325
 GAG AAT GGG AAT GCA ACT CCT CAA TTG ACA AAA AAT GGT GGG GGT TTA 1163
 Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu 325 330 335 340 345
 ACA TGT TCT CTC TCT AAA GGT TCT TGAATGCA TATATTGAC CATGTTGTAC 1211
 Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys 350
 TATTTAAAT AACATCAATA AAGAAATATA TGAATATGA TATTTGTATA TTGATGTCAA 1257
 AATAAAATG TATTTTTC TATTAAATA AAAATGATG GATTCGACGG TACTGTGAGA 1307

Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His 190 195 200
 Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe 205 210 215
 Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg 220 225 230 235 240 245 250
 Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr 240 245 250
 Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser 255 260 265
 Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr 270 275 280
 Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr 285 290 295
 Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr 300 305 310 315
 Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn 320 325 330
 Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys 335 340 345
 Ser Leu Ser Lys Arg Cys 350

配列番号: 2

配列の長さ: 374

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

配列

Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe Val Ile
 -21 -20 -15 -10
 Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 -5 1 5 10
 Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
 15 20 25
 Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val
 30 35 40
 Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg
 45 50 55
 Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn
 60 65 70 75
 Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr
 80 85 90
 Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys
 95 100 105
 Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu Tyr Leu
 110 115 120
 Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser
 125 130 135
 Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu
 140 145 150 155
 Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser
 160 165 170
 Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val Thr Ile
 175 180 185

配列番号: 3

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GAYAAAYCCNA THGAYWS

配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGGAATTCAA YTGCGCNCAR AAYSG

配列番号: 5

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴

特徴を表す記号: modified base

存在位置: 15

他の情報: /mod base=i

配列

CTGCAGCCRT TYTCNACRTT RAA

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴

特徴を表す記号: modified base

存在位置: 6

他の情報: /mod base=i

配列

TTCATNCKRT TYTGNGCCCA

配列番号: 7

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

CCTGCAGCKR TTYTGNGCCC AARTT

配列番号: 11

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GCAATGTACA TAGGCAT

配列番号: 12

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TCCAATTCTT CTGATGGT

配列番号: 13

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TTTTGTCAAT TGAGGAGT

配列番号: 8

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

ATGGATTCCC CTTGCTTA

配列番号: 9

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGGAATTCTGA TAATCCCATA GACAGC

配列番号: 10

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

ATGCCTATGT ACATTGC

配列番号: 14

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

CCTGCAGAAG CTTTCATCAAC AACGTTTAGA

配列番号: 15

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TAGCAACTC AGTCGAAGT

配列番号: 16

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TAGCTCTCAT TTGGTGC

配列番号: 17

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TATGCAATTG GTGGGAGT

配列番号: 18

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N-末端フラグメント

起源

生物名: クリプトメリア ジャポニカ (Cryptomeria J
aponica)

配列の特徴

特徴を表す記号: Modified-site

存在位置: 7

他の特徴: 記= "7位のアミノ酸はSer、Cys、Thr又はHis"

配列

配列番号: 21

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG

配列番号: 22

配列の長さ: 13

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

AATGATCGAT GCT

配列番号: 23

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGAATTCTCT AGACTGCAGG T

Asp Asn Pro Ile Asp Ser Xaa Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln
1 5 10 15
Asn Arg Met Lys
20

配列番号: 19

配列の長さ: 16

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

起源

生物名: クリプトメリア ジャポニカ (Cryptomeria J
aponica)

配列

Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys
1 5 10 15

配列番号: 20

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG ATCGATCATT

配列番号: 24

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

GGAATTCTCT AGACTGCAGG TTTTTTTTTT
TTTTT

配列番号: 25

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N-末端フラグメント

起源

生物名: ジュニベルス サビノイデス (Juniperus sab
inoides)

配列

Asp Asn Pro Ile Asp

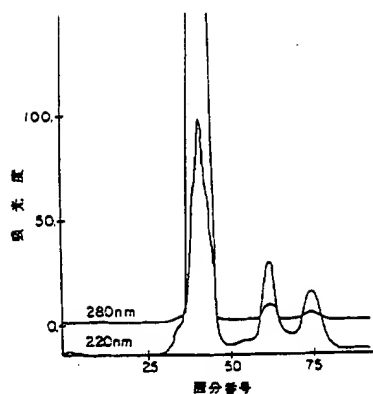


Fig. 1a

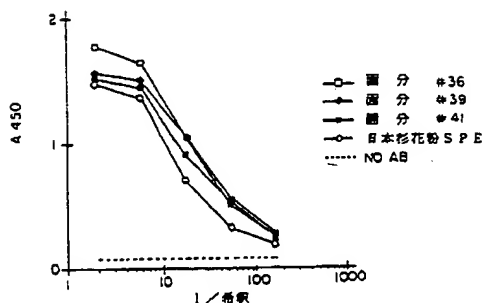


Fig. 3

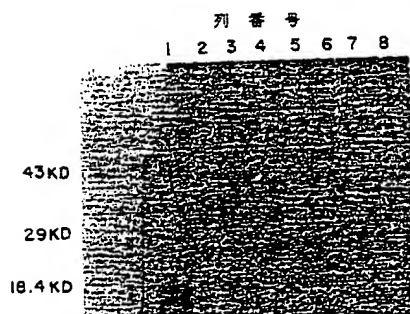


Fig. 1b



Fig. 2

5'-AGTCATCTG CTGATGTC TAGCATGCC GTATGAAAG AATTTCTACA CTCTCTACC 60
 AAAAA ATG GAT TCC OCT TGC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT 107
 Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe
 -21 -20 -18 -10
 GTA ATT GGA TCT TGC TTT TCT GAT AAT CCC ATA GAC AGC TCC TGG AGA 133
 Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg
 -5 1 9
 GGA GAC TCA AAC TGG GCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TGT GCA 203
 Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala
 10 13 20 23
 GTG GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG GGA GGC AAG GGA GGA GAT CTT TAT 231
 Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr
 30 35 40
 ACC GTC ACC AAC TCA GAT GAC GAC CTT GTG AAT CTT GCA GCA GCA ACT 299
 Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr
 45 50 55
 CTG GGC TAT GGA GCA ACC GGA GAT AGC GGC CTG TGG ATA ATT TTC AGT 347
 Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser
 60 65 70
 GGG AAT ATG AAT ATA AAG CTC AAA ATG CTT ATG TAC ATT GCT GGG TAT 393
 Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr
 75 80 85
 AAG ACT TTT GAT GGC AGG GGA GCA CAA GTT TAT ATT GGC AAT GGC GGT 443
 Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly
 90 100 105
 CCC TGT GTG TTT ATC AAG AGA GTT AGC AAT GTT ATC ATA CAC GGT TTG 491
 Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu
 110 115 120
 TAT CTG TAC GGC TGT AGT ACT AGT GTT TTG GGG AAT GTT TTG ATA AAC 539
 Tyr Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn
 125 130 135
 GAG AAT TTT GGG GTG GAG CCT GTT CAT CTT CAG GAT GGC GAT GCT CTT 587
 Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu
 140 145 150
 ACT CTG GGC ACT GCT ACA AAT ATT TGG ATT GAT CAT AAT TCT TTC TCC 635
 Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser
 155 160 165

Fig. 4a

AAT TCT TCT GAT GGT CTG GTC GAT GTC ACT CTT ACT TGG ACT GGA GTT 683
 Asn Ser Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val
 170 175 180
 ACT ATT TCA AAC AAT CTT TTT TTC AAC CAT CAT AAA GTG ATG TTT TTA 731
 Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu
 190 195 200
 GGG CAT GAT GAT GCA TAT AGT GAT GAC AAA TCC ATG AAG GTG ACA GTG 779
 Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Ser Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val
 205 210 215
 GCG TTC AAT CAA TTT GGA CTT AAC TGT GGA CAA AGA ATG CCC AGG GCA 827
 Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala
 220 225 230
 GGA TAT GGA CTT GTA CAT GTT GCA AAC AAT AAT TAT GAC GCA TGG ACT 875
 Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Asp Pro Trp Thr
 235 240 245
 ATA TAT GCA ATT GGT GGG AGT TCA AAT CCA ACC ATT CTA AAT GAA GGG 923
 Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Gly Gly
 250 255 260
 AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG AGC TAC AAG AAG CAA GTA ACC ATA 971
 Asn Ser Phe Thr Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile
 270 275 280
 GGT ATT GGA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGG GTG TGG CAA 1019
 Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln
 285 290 295
 TCT ACA GAA GAT GTT TTT TAT AAT GGA GCT TAT TTT GTA TCA TCA GGG 1067
 Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly
 300 305 310
 AAA TAT GAA GGG GGT AAT ATA TAC ACA AAG AAA GAA GCT TTC AAT GTT 1115
 Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val
 315 320 325
 GAG AAT GGG AAT GCA ACT CTT CAA TTG ACA AAA AAT GCT GGG GTT TTA 1163
 Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu
 330 335 340
 ACA TGC TCT CTC TCT AAA CTT TGT TGTATGTCG TATATTCTAG CATGTTTATC 1217
 Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys
 350
 TATCTAATT AACATCAACA AGAAATATA TCATGATGTA TATGTTGTA TTGATGTCAA 1277
 AATAAAATG TATCTTTTAC TATTAAAAA AAAATGATC GATCGAGCC TACCTCTAGA-3' 1337

Fig. 4b

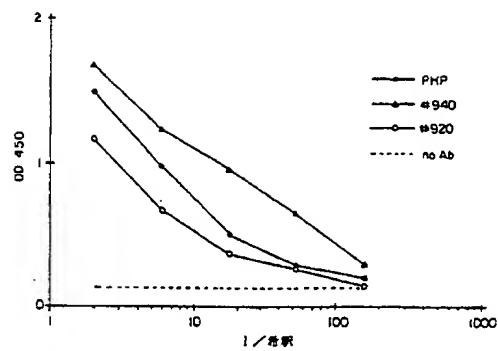


Fig. 5a

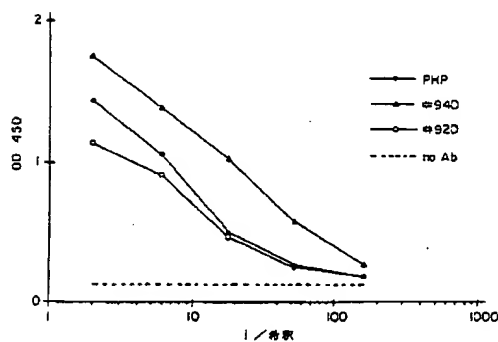


Fig. 5b

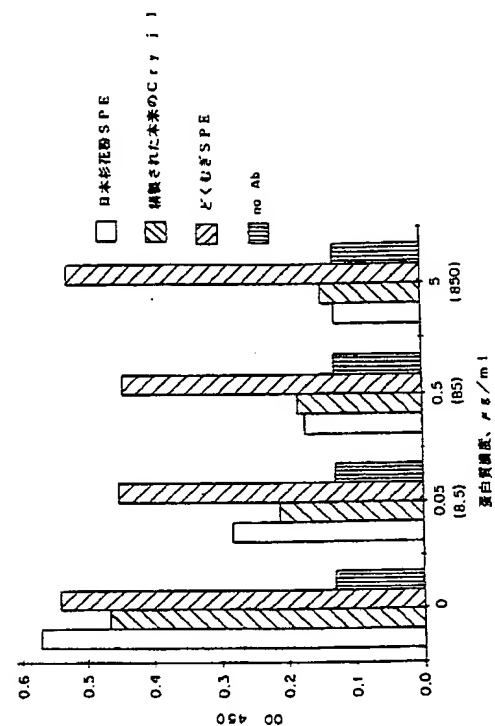


Fig. 6

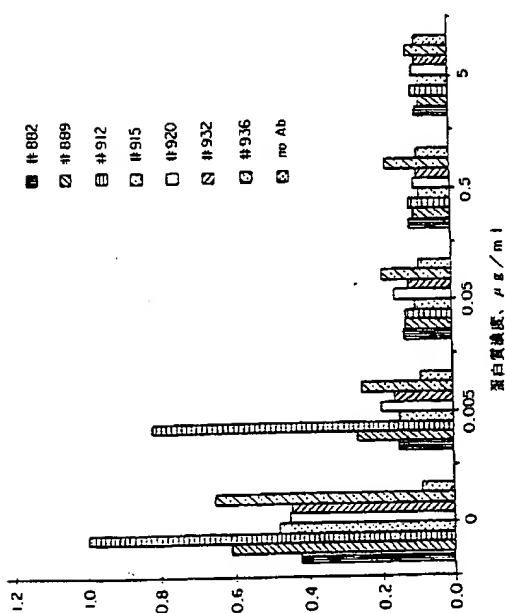
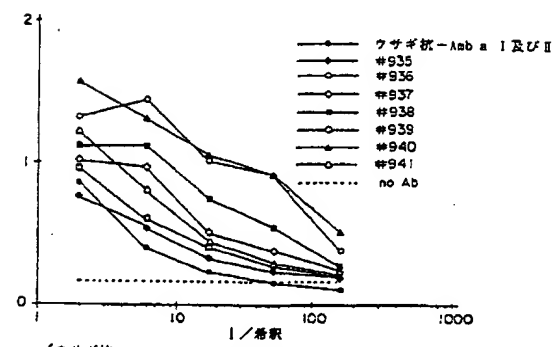
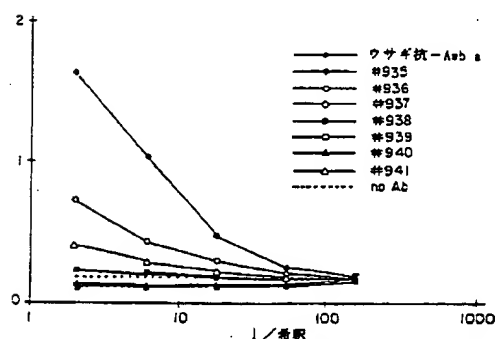


Fig. 7



(ウサギ抗-Ab a I 及び II を除く、この場合の希釈は×1000)

Fig. 8a



(ウサギ抗-Ab a I 及び II を除く、この場合の希釈は×1000)

Fig. 8b

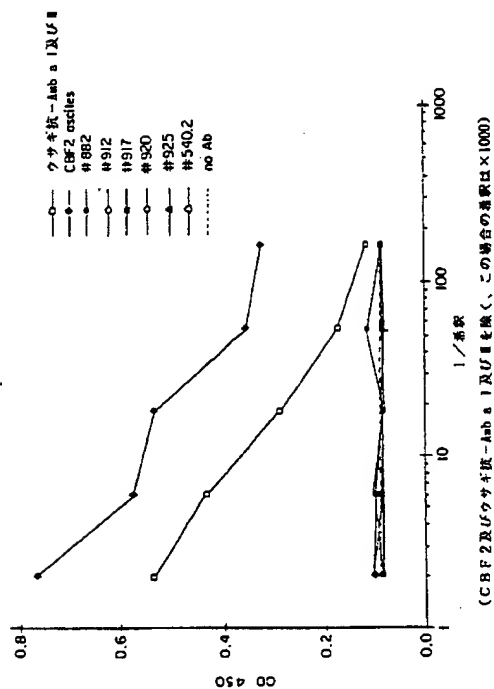


Fig. 9

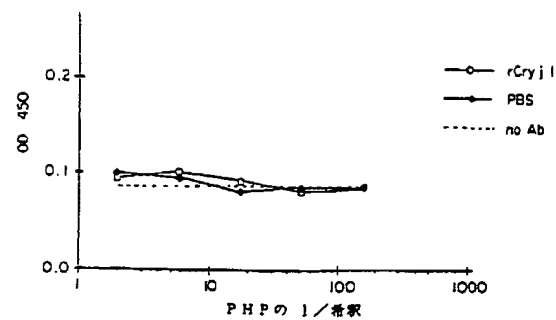


Fig. 10a

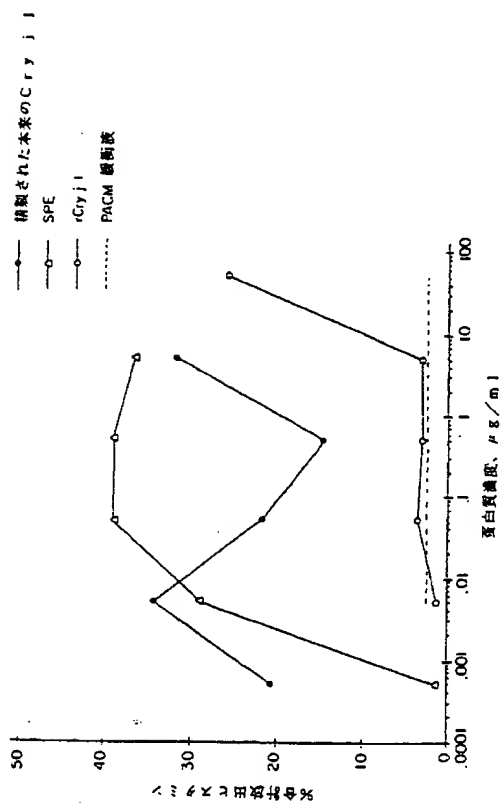
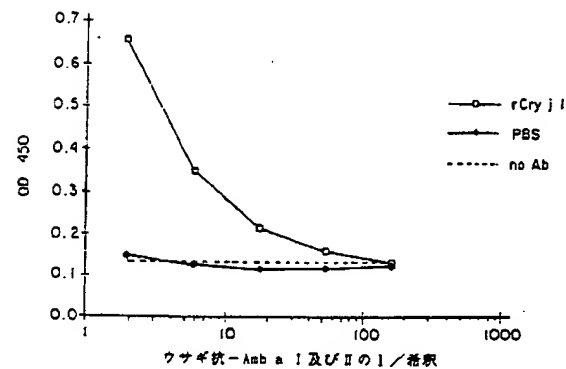


Fig. 11

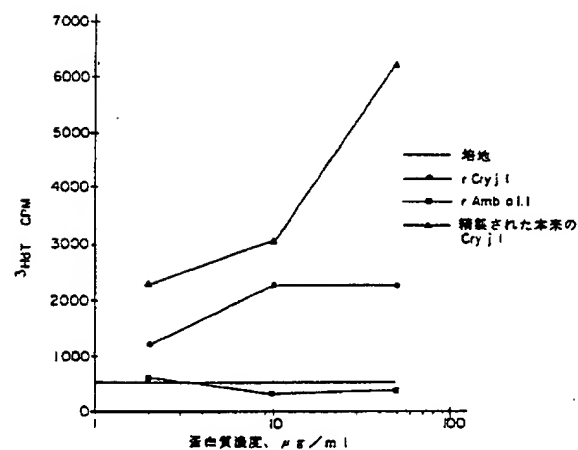


Fig. 12

International Application No. PCT/US 92/05661

18. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		(CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)
Country	File No. of document, with indication, where appropriate, of the original version	Interest to Case No.
X	EP, A1, 0308147 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 22 March 1989, see especially claim 2	5,8,11- 36,43
	-- -----	

analysis application No.

PCT/US92/03661

國際調查報告

PC9/US 92/05661

SA 62104

This was the stated identity of the members appearing in the federal documents filed in the above-mentioned international search report. The membership list is contained in the European Patent Office TSD No. 28/08/92 The European Patent Office is an agency of the European Communities and is not a part of the United States of America.

Document document class. in source's report	Publication date	Present in only document(s)	Publication date
EP-A1- 0416816	13/03/91	JP-A- US-A-	3093730 5073628 18/04/91 17/12/91
EP-A1- 0308147	22/03/89	JP-A- US-A-	1156925 4939239 20/06/89 03/07/90

For more details contact the nearest office of the European Central Office, No. 12/51

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B	
G 0 1 N 33/53		Q 8310-2J	
33/577		B 8310-2J	
//(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
L, SE), AU, CA, JP, KR

(72)発明者 ボンド, ジュリアン, エフ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02188ウ
エイマウス・コマーシャルストリート294

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年5月9日(2000.5.9)

【公表番号】特表平6-508994

【公表日】平成6年10月13日(1994.10.13)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-502370

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/00 637

39/36

39/395

C07K 14/415

16/16

C12P 21/02

G01N 33/53

33/577

//(C12P 21/02

C12R 1:19)

【FI】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/00 637 E

39/36

39/395 N

C07K 14/415

16/16

C12P 21/02 C

G01N 33/53 Q

33/577 B

特許庁長官 伊佐山 健 彦 殿

平成11年7月7日

特許庁長官 伊佐山 健 彦 殿

1. 事件の表示

平成5年特許願第502370号

2. 修正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 イミューロジック・ファーマシューチカル・コーポレーション

3. 代理人

〒107-0052

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本 監 査 会 館

氏名(印)弁護士 小田島 平 吉

電話 3585-2256



4. 補正命令の日付 なし(自発)

5. 補正の対象

「請求の範囲」及び「明細書」

6. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙のとおり訂正する。

(2) 明細書第60頁1～4行に「本発明をその好ましい・・・従うものとする。」とあるを削除し、次の文を加入する。

『本発明の主な態様は次のとおりである。』

1. 日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同物。

2. 該核酸配列が配列番号:1の塩基56-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記1に記載の核酸配列。

3. 該核酸配列が配列番号:1の塩基129-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記1に記載の核酸配列。

4. 該核酸配列が基本的に配列番号:1の核酸配列のコード部分の少なくとも1個のフラグメントを含むことを特徴とする、前記1に記載の核酸配列。

5. 日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的同物を含む発現ベクター。

6. 該核酸配列が配列番号:1の塩基56-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記5に記載の発現ベクター。

7. 該核酸配列が配列番号:1の塩基129-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、前記5に記載の発現ベクター。

8. 該核酸配列が基本的に配列番号:1の核酸配列のコード部分の少なくとも1個のフラグメントを含むことを特徴とする、前記5に記載の

発現ベクター。

9. 前記1、2、3又は4に記載の核酸配列によりコードされる蛋白質又はペプチドを発現するように形質転換された宿主細胞。

10. 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする、前記9に記載の宿主細胞。

11. 前記1、2、3又は4に記載の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のその抗原性フラグメント。

12. 該日本杉花粉アレルゲンが日本杉花粉に関して特異的な免疫グロブリンIgEと結合しないか、又は該免疫グロブリンEへの日本杉花粉アレルゲンの結合が弱くなる場合、そのような結合が肥満細胞又は好塩基球からのヒスタミンの放出を生じないことを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。

13. 該日本杉花粉アレルゲンが、精製された本来の日本杉花粉アレルゲンが免疫グロブリンEに結合する場合より実質的に低い密度で該免疫グロブリンEに結合することを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン。

14. 宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする、前記11に記載の精製日本杉花粉アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

15. a) 日本杉花粉アレルゲンCry j I又はそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞を、該日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む細胞及び培養地の混合物の生産に用いた培養地で培養し、

b) 該混合物を精製して実質的に純粋な日本杉花粉アレルゲンCry j I

I又は少なくとも1個のそのフラグメントを生産する段階を含む、日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントの生産法。

16. 日本杉花粉アレルゲンCry j Iの全長又は一部をコードする核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。

17. 少なくとも1個のそのフラグメントが抗原性フラグメントであることを特徴とする、前記16に記載の蛋白質組成物。

18. 化学的に合成された日本杉花粉アレルゲンCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。

19. 該Cry j Iが配列番号:1のアミノ酸配列を有することを特徴とする、前記16又は18に記載の蛋白質組成物。

20. 日本杉花粉からのアレルゲンの塩融抗原性フラグメント。

21. 日本杉花粉からの該アレルゲンがCry j Iであることを特徴とする、前記20に記載の抗原性フラグメント。

22. 該抗原性フラグメントが少なくとも1個のT細胞エпитープを含むことを特徴とする、前記20又は21に記載の抗原性フラグメント。

23. 該抗原性フラグメントが最小の免疫グロブリンE受容体活性を有することを特徴とする、前記22に記載の抗原性フラグメント。

24. 該抗原性フラグメントが日本杉花粉に特異的な免疫グロブリンに結合しないか、又は該免疫グロブリンEへのフラグメントの結合が弱くなる場合、そのような結合は肥満細胞又は好塩基性細胞からヒスタミン

を放出させないことを特徴とする、前記22に記載の抗原性フラグメント。

25. 該抗原性フラグメントが、精製された本来の日本杉花粉アレルギーが免疫グロブリンEに結合する場合より実質的に低い程度で該免疫グロブリンEに結合することを特徴とする、前記20に記載の抗原性フラグメント。

26. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが、それを投与した日本杉花粉感受性患者において、日本杉花粉に対するアレルギー応答を改変することができることを特徴とする、前記11、20、21又は22に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。

27. 該精製アレルゲン又は該抗原性フラグメントが患者の日本杉花粉アレルギーに対するB細胞応答、患者の日本杉花粉抗原に対するT細胞応答、又は患者の日本杉花粉アレルギーに対するB細胞応答とT細胞応答の両方を改変することができることを特徴とする、前記26に記載の精製アレルゲン又は抗原性フラグメント。

28. 前記20に記載の日本杉花粉アレルギーの抗原性フラグメントをコードする核酸配列。

29. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルギーに対する患者のアレルギー応答を低下させる、改変日本杉花粉アレルギー。

30. 該改変日本杉花粉アレルギーが改変Cry j 1蛋白質であることを特徴とする、前記29に記載の改変日本杉花粉アレルギー。

31. 日本杉花粉感受性患者に投与すると日本杉花粉アレルギーに対する患者のアレルギー応答を低下させる、日本杉花粉アレルギーの少なくとも1個の改変フラグメント。

40. 哺乳類から得た血液試料を、前記1に記載の核酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルギー又はこの抗原性フラグメントと、血液成分と蛋白質又はそのフラグメントの結合に適した条件下で混合、結合が起こる程度を決定する段階を含む、哺乳類における日本杉花粉アレルギーに対する感受性の検出法。

41. 結合が起こる程度をT細胞増殖能、T細胞増殖率、B細胞増殖能、蛋白質又はそのフラグメントの溶液中に存在する抗体との結合、又はそれらの組み合わせの評価により決定することを特徴とする、前記40に記載の方法。

42. 前記1に記載の核酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルギーCry j 1又はその抗原性フラグメントを哺乳類中でアレルギー応答を起こすのに十分な量で該哺乳類に投与し、該患者において該日本杉花粉アレルギー又はその抗原性フラグメントに対するアレルギー応答が起こるかどうかを決定する段階を含む、日本杉花粉アレルギーに対する哺乳類の感受性の検出法。

43. 日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントと特異的に反応性のモノクローナル抗体。

32. 少なくとも1個の該改変フラグメントがCry j 1蛋白質の改変フラグメントであることを特徴とする、前記31に記載の少なくとも1個の改変フラグメント。

33. Cry j 1又はそのフラグメントに免疫学的に関連する単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

34. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントがCry j 1又はそのフラグメントに特異的な抗体と結合することを特徴とする、前記33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

35. 該蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメントがCry j 1又はそのフラグメントに特異的なT細胞を誘発できることを特徴とする、前記33に記載の単離蛋白質アレルゲン又はその抗原性フラグメント。

36. 精製日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のそのフラグメント、及び製造学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む、治療組成物。

37. Cry j 1が配列番号: 1のアミノ酸1353の配列を有することを特徴とする、前記36に記載の治療組成物。

38. 哺乳類に治療的有効量の該前記16又は18に記載の蛋白質組成物を投与することを含む、日本杉花粉アレルギー又は日本杉花粉アレルギーと免疫学的に交差反応性のアレルギーに感受性の哺乳類において、該アレルギーに対する感受性を改善する方法。

39. 例えば日本杉花粉アレルギー又は日本杉花粉アレルギーと交差反応性のアレルギーに対する患者の感受性の処置など治療において用いるための前記16又は18に記載の蛋白質組成物。

【別紙】

請求の範囲

1. 日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能等同物。

2. 該核酸配列が配列番号: 1の塩基66-1187のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求の範囲1に記載の核酸配列。

3. 日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントをコードする核酸配列、あるいは該核酸配列の機能等同物を含む発現ベクター。

4. 請求の範囲1または2に記載の核酸配列によりコードされる蛋白質又はペプチドを発現するように形質転換された宿主細胞。

5. 請求の範囲1または2に記載の核酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で生産された精製日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のその抗原性フラグメント。

6. a) 日本杉花粉アレルギーCry j 1又はそのフラグメントをコードするDNA配列を用いて形質転換された宿主細胞を、該日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む細胞及び培地の混合物の生産に適した培地中で培養し、

b) 該混合物を精製して純粋な日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のそのフラグメントを生産する段階を含む、日本杉花粉アレルギーCry j 1又は少なくとも1個のそのフラグメントの生産法。

7. 日本杉花粉アレルギーCry j 1の全体又は一部をコードす

る塩酸配列を用いて形質転換された宿主細胞中で合成された日本杉花粉アレルギーCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。

8. 化学的に合成された日本杉花粉アレルギーCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメントを含む蛋白質組成物。

9. 日本杉花粉からのアレルギーの単離抗原性フラグメント。

10. 請求の範囲20に記載の日本杉花粉アレルギーの単離抗原性フラグメントをコードする核酸配列。

11. 改良日本杉花粉アレルギーを有効成分とする日本杉花粉アレルギーに対する感受性患者のアレルギー応答を低下させるための製剤。

12. 日本杉花粉アレルギーの少なくとも1個の改良フラグメントを有効成分とする日本杉花粉アレルギーに対する感受性患者のアレルギー応答を低下させるための製剤。

13. Cry j I又はそのフラグメントに免疫学的に関連する単離型蛋白質アレルギー又はその抗原性フラグメント。

14. 精製日本杉花粉アレルギーCry j I又は少なくとも1個のそのフラグメント、及び製薬学的に許容し得る担体又は希釈剤を含む、治療組成物。

15. 哺乳類から得た内臓試料を、請求の範囲1に記載の塩酸配列を用いて形質転換した宿主細胞中で生産された、又は化学的に合成された精製日本杉花粉アレルギー又はこの抗原性フラグメントと、血液成分と蛋白質又はそのフラグメントの結合に適した条件下で合わせ、結合が応答を決定する段階を含む、哺乳類における日本杉花粉アレルギーに対する感受性の検出法。

16. 日本杉花粉アレルギーCry j I又は少なくとも1個のその抗原性フラグメントと特異的に反応性のモノクローナル抗体。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.